Die Lipase aus *Rhizopus oryzae*: Klonierung, Expression, Reinigung und Mutagenese eines industriell relevanten Enzyms für die Biokatalyse und die Strukturbestimmung

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Stefan Minning

aus Stuttgart

Hauptberichter:	Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter:	Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Wolfgang Kaim

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.1999

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
1999

Das Licht der Wissenschaft birgt die Gefahr,
daß man glauben kann, die Welt und man selbst
seien ganz erfaßt, während man in Wirklichkeit von
der Lichtquelle geblendet ist und deshalb seine Umgebung
dunkel und unverständlich sieht, während die eigene Nase
strahlend hell erleuchtet ist.

PETER HØEG

Von der Liebe und ihren Bedingungen in der Nacht des 19. März 1929

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rolf D. Schmid für seine Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die er bereitstellte. Insbesondere möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an verschiedenen Projektbesprechungen des EU-Projekts Bio4-CT96-0005 teilzunehmen.

Prof. Dieter H. Wolf und Prof. Wolfgang Kaim danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Carles Solá, Prof. Francisco Valero, Dr. Pau Ferrer und Alicia Serrano bedanken. Neben der Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit an ihrem Institut anzufertigen, danke ich besonders für die Einführung in die spanische und katalanische Lebenskultur.

Mattias Persson danke ich für die Zusammenarbeit bei der Mutagenese der ROL.
Den weiteren Teilnehmern am EU Projekt Bio4-CT96-0005 danke ich für die freundschaftlichen und manchmal auch hitzigen Diskussionen in verschiedenen Städten Europas.
In diesem Zusammenhang danke ich der Europäischen Gemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des oben genannten Projekts.
Dr. Claudia Schmidt-Dannert und Dr. Jutta Schmitt danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie und eine Reihe nützlicher Tips sowie Volker Nödinger für die Protein- und DNA-Sequenzierung und der Bereitstellung aller Dinge, die man zum molekularbiologischen Arbeiten braucht. Prof. Dr. Uwe Bornscheuer danke ich für seine Bereitschaft zur Korrektur diverser Manuskripte sowie einer Reihe anregender Diskussionen.
Dr. Markus Enzelberger für die nette Zusammenarbeit bei der Entwicklung des HeliTags.
Holger Scheib für die Anfertigung von Molecular Modelling Bildern. Bei Dr. Frank Zocher, Markus Fischer, Christian Gentner, Sandra Vorlová und Erik Henke möchte ich mich für die netten Unterhaltungen am Kaffeetisch und beim Capuccino am Nachmittag und bei allen anderen Mitarbeitern am ITB für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums.
Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Sandra für die Unterstützung und das Verständnis während des ganzen Studiums

.

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AOX	Alkoholdioxygenase
ATCC	*American Type Culture Collection*
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BDW	Biotrockenmasse (*Bio Dry Weight*)
BWW	Biofeuchtmasse (*Bio Wet Weight*)
CRL	Lipase aus *Candida rugosa*
DAG	Diacylglycerid
ddNTP´s	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP´s	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DO	*dissolved oxygen* (gelöster Sauerstoff)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
GAP	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GCL	Lipase aus *Geotrichum candidum*
(E)GFP	*(Enhanced) Green Fluorescent Protein*
h	Stunde
HeliTag	Variierte Aminosäuresequenz der Metallbindungsstelle einer ATPase aus *Helicobacter pylori*
HIC	Chromatographie basierend auf hydrophoben Wechselwirkungen
His/His_6	Aminosäuresequenz mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinen (HisTag)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Lip	Lipase
MAG	Monoacylglycerid
mg	Milligramm

Mut^+	Methanol toleranter Phänotyp von *Pichia pastoris*
Mut^S	Methanol sensitiver Phänotyp von *Pichia pastoris*
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
OD_{600}	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	*open reading frame* (offenes Leseraster)
p	Plasmid
P	Promotor
P.	*Pichia*
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pNPP	*p*-Nitrophenolpalmitat
PPRL	λ-Promotor
PrePro	Signalsequenz einer nativen Lipase
R.	*Rhizopus*
RDL	Lipase aus *Rhizopus delemar*
RML	Lipase aus *Rhizomucor miehei*
RNL	Lipase aus *Rhizopus niveus*
ROL	Lipase aus *Rhizopus oryzae*
RT	Raumtemperatur
S.	*Saccharomyces*
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shl ble	Resistenzgen aus *Streptoalloteichus hindustanus* gegen Bleomycin
sn	Stereochemische Nummerierung
sp.	spezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglyceride
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TMM	Tributyrin-Minimalmedium
U	*Units*
U min^{-1}	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtyp
WtHeliTag	Wildtypsequenz der Metallbindungsstelle einer ATPase aus *Helicobacter pylori*
Zeo	Zeocin™

Nukleotide und Aminosäuren sind nach den allgemein gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencodes abgekürzt, wie in jedem Lehrbuch der Biochemie zu finden.

1 Einleitung

1.1 Lipasen

1.1.1 Übersicht

Lipasen (Triacylglycerin-Acylhydrolasen, E.C. 3.1.1.3) hydrolyieren die Ester-Bindungen in Triacylglyceriden (TAG) und den davon abgeleiteten Di- (DAG) und Monoacylglyceriden (MAG) sowie einer Reihe anderer Ester. Die Reaktion ist in der Regel reversibel, so daß Lipasen ebenfalls zur Synthese von Estern dienen können. Wie alle anderen Hydrolasen sind Lipasen Cofaktor unabhängig. Charakteristisch für Lipasen, im Gegensatz z. B. zu Esterasen, ist deren Aktivierung an Grenzflächen (engl. *interfacial activation*). Befinden sich Lipasen an einer solchen Grenzfläche, erhöht sich ihre Aktivität signifikant gegenüber der in wässriger Lösung. Die Grenzflächenaktivierung konnte schon in der Vergangenheit durch Messungen der Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt werden. Eindeutig nachgewiesen wurde sie jedoch erst in jüngerer Zeit durch Röntgenstrukturanalyse (Brady, *et al.* 1990, Grochulski, *et al.* 1993, Winkler, *et al.* 1990). Es konnte gezeigt werden, daß das aktive Zentrum der Lipase von einer Oligopeptideinheit (engl. *Lid*) überlagert wird. Bindet nun eine Lipase an die hydrophobe Grenzfläche, so öffnet sich das *Lid* und das aktive Zentrum ist für das Substrat zugänglich.

Lipasen sind in der Lage, Reaktionen in organischen Lösungsmitteln ohne, oder in Gegenwart geringer Mengen Wasser zu katalysieren und sind dadurch eine interessante Enzymklasse für die Biokatalyse. Einsatzgebiete sind hier die Veresterung, die Umesterung, sowie die Alkoholyse (siehe Kapitel 1.1.3).

Im Gegensatz zu anderen hydrolytischen Enzymen, insbesondere Proteasen, werden Lipasen bisher nur zu einem geringen Teil industriell genutzt. Von dem geschätzten Umsatz von 1 Milliarde US-Dollar für Enzyme entfielen 1994 nur 7 % auf Lipasen. Sie werden in der Hauptsache in Waschmitteln eingesetzt, aber auch für Diätprodukte und in der organischen Synthese (Sheldon 1996). Detailliertere Angaben zu industriellen Applikationen von Lipasen finden sich in der Literatur (Bornscheuer und Kazlauskas 1999, Haas und Joerger 1995, Schmid und Verger 1998).

R = C_7H_{15}

Abbildung 1.1: Hydrolyse eines Triacylglycerins am Beispiel der Spaltung von Trioctanoin mit einer nicht regiospezifischen Lipase.

Lipasen sind in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen weit verbreitet. Mikrobielle Lipasen sind sowohl in Bakterien, wie auch in Hefen und Pilzen bekannt, einige Beispiele hierfür sind: *Chromobacterien, Pseudomonaden, Staphylokokken, Candida, Aspergillus, Mucor* und *Rhizopus* und viele andere. Lipasen, die für die Biokatalyse verwendet werden, sind in der Regel mikrobieller Herkunft, da sie vergleichsweise einfach durch Fermentation, gefolgt von wenigen Aufreinigungsschritten, hergestellt werden können. Detaillierte Übersichtsartikel über die biochemischen Eigenschaften von Lipasen finden sich in der Literatur (Gilbert 1993, Jaeger 1994, Jaeger*, et al.* 1994). In Menschen und anderen Säugetieren sind eine Reihe verschiedener Lipasen in die Verdauung, Adsorption und Modifikationen von Fetten sowie in den Lipoprotein-Metabolismus involviert (Carriere*, et al.* 1994, Desnuelle 1986). Auch in der Pflanzenwelt sind Lipasen weit verbreitet (Mukherjee 1994).

1.1.2 Struktur und Reaktionsmechanismus von Lipasen

Lipasen gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen. Die Gemeinsamkeit aller Lipasen ist die katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat (bei den Lipasen aus *Geotrichum candidum* und *Candida rugosa* Glutamat). Der Reaktionsmechanismus entspricht dem der Serin-Proteasen (Cambillau und van Tilbeurgh 1993, Cygler, *et al.* 1992, Derewenda, *et al.* 1992, Derewenda, *et al.* 1994, Dodson, *et al.* 1992, Ransac, *et al.* 1996). Vor der Esterspaltung kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Esters und dem *Oxyanion hole* (Sauerstoffbindungsstelle) des Proteins (Abbildung 1.2). Es bildet sich der Michaelis-Komplex. Im ersten Reaktionsschritt kommt es zum nukleophilen Angriff des Serins am Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats. Die Nukleophilie des Serins wird durch die Abstraktion des Wasserstoffs der Hydroxylgruppe durch das ε-N-Atom des Histidins erhöht. Die bei diesem Vorgang entstehende positive Partial-Ladung am Histidin wird teilweise durch das Aspartat der katalytischen Triade neutralisiert. Beim nukleophilen Angriff des Serins auf den Carbonyl-Kohlenstoff ändert dieser die Hybridisierung von sp^2 nach sp^3 und es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung. Gleichzeitig wird die negative Ladung des Serins auf den Sauerstoff des Acetals übertragen und durch H-Brücken im *oxyanion-hole* fixiert. Es entsteht das erste Intermediat (T_d1). Im nächsten Schritt überträgt das Histidin das vorübergehend abstrahierte Proton auf die Alkoholkomponente des Acetals. Es entsteht eine gute Austrittsgruppe. Die Abspaltung dieser Gruppe wird durch die Ausbildung einer Doppelbindung zwischen Sauerstoff und Kohlenstoff des Acetals unterstützt, wobei der Kohlenstoff wieder von sp^3 zu sp^2 hybridisiert wird. Das Acylenzym, ein Carbonsäure-Serin-Ester entsteht, und der freie Alkohol verläßt die Bindungstasche. Diesen Platz nimmt ein Wassermolekül ein. In Umkehr der vorangegangenen Schritte bildet sich ein zweites Halbacetal aus (T_d2). Hier wird das Proton vom Histidin auf das Serin übertragen. Dadurch wird die Bindung des Serin Sauerstoffs zum Kohlenstoff gespalten und dieser hybridisiert von sp^3 zu sp^2. Damit ist der Katalyseprozeß beendet und die Fettsäure verläßt die Bindungstasche.

Abbildung 1.2: Mechanismus der Hydrolyse eines Buttersäureesters.

Die Aminosäurereste und deren Nummerierung entsprechen dem aktiven Zentrum der Lipase aus *Rhizopus oryzae* (ROL).

Das katalytische Zentrum wird aus den Aminosäuren Asp_{204}, His_{257} und Ser_{145} gebildet. Die α-Aminogruppen der Reste Thr_{83} und Leu_{146} bilden das *Oxyanion hole* der ROL, gestrichelte Linien stellen denkbare H-Brücken dar.

Bei allen bisher strukturell aufgeklärten Lipasen liegt eine sogenannte α/β-Hydrolasefaltung als gemeinsames Motiv vor (Ollis, *et al.* 1992). Diese besteht aus acht, meist parallelen β-Faltblättern, die auf beiden Seiten von α-Helices umgeben sind.

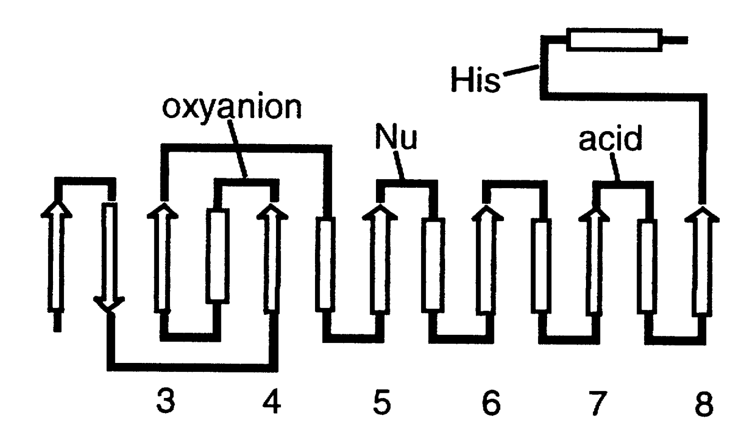

Abbildung 1.3: Die α/β -Hydrolasefaltung.

Die acht β-Faltblätter sind jeweils von zwei α-Helices umgeben.

Oxyanion bezeichnet die Region des Enzyms, in dem der negativ geladene Sauerstoff im Verlauf der Katalyse im T_d1 Zustand stabilisiert wird; acid (Asp o. Glu), Nu (Ser) und His bezeichnen die Aminosäuren der katalytischen Triade.

1.1.3 Reaktionen mit Lipasen

1.1.3.1 Hydrolyse

Ein Beispiel für die Hydrolyse von Estern mit Lipasen ist die Spaltung von Triglyceriden in einer Triglycerid/Wasser Emulsion (Abbildung 1.1). In dieser können verschiedene Lipasen äußerst unterschiedliche Eigenschaften zeigen.

Während manche Lipasen alle drei Fettsäuremoleküle abspalten, zeigen andere Lipasen eine strenge 1,3-Regioselektivität. Durch Acylwanderung wird diese Regioselektivität in wässriger Lösung aufgehoben (siehe Abbildung 1.4, Übersichtsartikel: (Bornscheuer, *et al.* , Bornscheuer und Kazlauskas 1999, Schmid und Verger 1998). Das Triglycerid wird regioselektiv gespalten, es bleibt also das 2-Monoacylglycerid zurück. Die Acylgruppe wandert dann aber von der 2 in die 1 oder 3 Position und wird dort von der Lipase hydrolysiert. Es entsteht also freies Glycerin (Abbildung 1.4), bzw. eine Mischung aus allen denkbaren Produkten.

Abbildung 1.4: Acylwanderung am Beispiel der hydrolytischen Spaltung von Trioctanoin mit der Lipase aus *Rhizopus delemar* (RDL).

1.1.3.2 Veresterung und Umesterung

Lipasen tolerieren neben Wasser auch andere Nukleophile als Substrat, wie z. B. Alkohole, Amine und Thiole (Abbildung 1.5). Sie setzen diese in Abwesenheit von Wasser mit Säuren und Estern um, während man die Reaktion der Säure als Veresterung bezeichnet, wird für die Umesterung eines Esters mit einem zweiten Alkohol der Begriff Alkoholyse verwendet.

$$R_1{-}C({=}O){-}OH \; + \; R_2OH \rightleftharpoons R_1{-}C({=}O){-}OR_2 \; + \; H_2O$$

$$R_1{-}C({=}O){-}OR_3 \; + \; R_2OH \rightleftharpoons R_1{-}C({=}O){-}OR_2 \; + \; R_3OH$$

Abbildung 1.5: Veresterung einer Carbonsäure und Alkoholyse.

Lipasen können auch die Umesterung eines Esters mit einer Säure (Acidolyse) oder einem anderen Ester katalysieren (Abbildung 1.6). Diese Reaktionen werden üblicherweise ebenfalls unter Ausschluß von Wasser oder mit nur Spuren von Wasser durchgeführt.

$$R_1{-}C({=}O){-}OR_2 \; + \; R_3{-}C({=}O){-}OH \rightleftharpoons R_1{-}C({=}O){-}OH \; + \; R_3{-}C({=}O){-}OR_2$$

$$R_1{-}C({=}O){-}OR_2 \; + \; R_3{-}C({=}O){-}OR_4 \rightleftharpoons R_1{-}C({=}O){-}OR_4 \; + \; R_3{-}C({=}O){-}OR_2$$

Abbildung 1.6: Umesterungsreaktionen mit Lipasen.

1.1.4 Anwendung von Lipasen

Wie oben erwähnt, finden Lipasen in zahlreichen Reaktionen Verwendung. Entsprechend der Substrate kann man folgende Einteilung treffen:

1. Modifikation von Fetten und Ölen (eine Übersicht über Reaktionen dieses Typs mit *Rhizopus* sp. Lipasen befindet sich in Kapitel 1.1.5.4.1).
2. Synthese chiraler Verbindungen (Übersicht für *Rhizopus* sp. Lipasen siehe Kapitel 1.1.5.4.2)
3. Acylierung und Deacylierung von Kohlenhydraten bzw. Schützen und Entschützen von Aminosäuren (Übersicht für *Rhizopus* sp. Lipasen siehe Kapitel 1.1.5.4.3).

In den folgenden Kapiteln wird speziell auf die Verwendung der *Rhizopus sp.* Lipasen eingegangen. Für die Verwendung anderer Lipasen sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen (einige neuere Übersichtsartikel: (Bornscheuer 1995, Bornscheuer und Kazlauskas 1999, Haas und Joerger 1995, Kazlauskas und Bornscheuer 1998, Marangoni 1995, Schmid und Verger 1998, Villeneuve 1997)

1.1.5 Rhizopus Lipasen

1.1.5.1 Allgemeines

Die Familie *Rhizopus* sp. gehört zu den *Mucorales* (Klasse der Jochpilze, *Zygomyceten*, Abteilung der *Amastigomycota*), zu denen beispielsweise auch der Brotschimmel gehört. Vertreter dieser Spezies kommen sowohl im Boden, wie auch als Parasit auf oder in Früchten, Pflanzen, Pilzen und Tieren vor. Einige Arten können auch den Menschen befallen, allerdings sind sie nur schwach pathogen und befallen so nur kranke und geschwächte Menschen (Haas und Joerger 1995). Vor 15 Jahren fand eine Reklassifizierung der Familie *Rhizopus* sp. statt, in der unter anderem *Rhizopus niveus* IFO 9759, *Rhizopus delemar* ATCC 34612 und *Rhizopus javanicus* ebenfalls als *Rhizopus oryzae* ATCC 853 bezeichnet wurden (Schipper 1984), Übersichtsartikel: (Haas und Joerger 1995).
Dieser taxonomische Befund konnte durch den Sequenzvergleich der Lipasen aus *Rhizopus niveus* (RNL), *Rhizopus delemar* (RDL) und *Rhizopus javanicus* (RJL) mit der aus *Rhizopus oryzae* (ROL) bestätigt werden. Die Aminosäuresequenzen von RNL, RDL und RJL sind identisch und unterscheiden sich von der von ROL nur durch zwei Aminosäuren (His134Asn und Ile234Leu). Lipasen aus der Familie *Rhizopus* sp. zeichnen sich in der Regel durch eine

starke 1,3-Regioselektivität bei der Hydrolyse von Triglyceriden aus, unterscheiden sich jedoch leicht durch ihre Stereoselektivität und Kettenlängenspezifität (Rogalska, *et al.* 1993). Die verschiedenen Eigenschaften der Lipasen, die in kommerziellen Präparationen gefunden wurden, konnten auf unterschiedliche Produkte bei der Abspaltung der Pro-Sequenz zurückgeführt werden (Uyttenbroeck, *et al.* 1993). Trotzdem werden in der Literatur und in dieser Arbeit, um Irritationen zu vermeiden, die alten Namen weiterhin verwendet (Haas und Joerger 1995).

1.1.5.2 Dreidimensionale Struktur der Lipase aus *Rhizopus oryzae*

Liegen für ein Protein keine experimentellen Strukturdaten vor, so kann ein Homologiemodell aus einem nahe verwandten Protein erstellt werden.

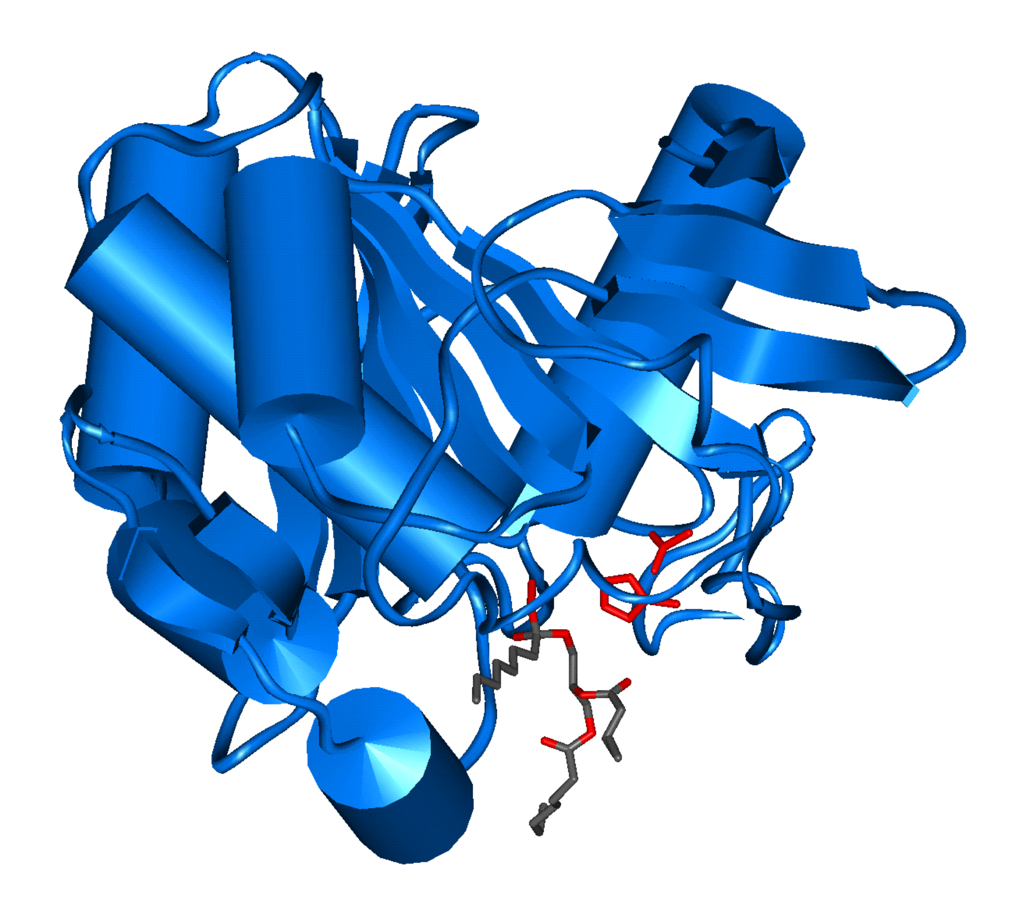

Abbildung 1.7: Struktur der *Rhizopus oryzae* Lipase als Acylenzym mit Trioctanoin als Substrat. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind rot dargestellt.

Die Vorgehensweise ist folgende, es werden zuerst die Aminosäuresequenzen der Proteine verglichen und bestmöglich überlagert. Anschließend überträgt man die Atomkoordinaten des Protein-Rückgrates vom Ausgangs- auf das Zielprotein. Die Seitenketten werden dann rechnerisch hinzugefügt und das gesamte System energetisch minimiert.

Für die *Rhizopus sp.* Lipasen liegen bisher keine Kristallstrukturen mit geöffnetem *Lid* vor. Allerdings konnte eine halbgeöffnete RDL, bei der aus experimentellen Gründen jedoch nur das Proteingerüst aufgelöst werden konnte (PDB Eintrag: 4tgl; (Derewenda, *et al.* 1992)) und eine geschlossene Form der RNL kristallisiert werden (PDB Eintrag: 1lgy (Bernstein, *et al.* 1977, Khono, *et al.* 1996)).

Aus diesen Daten wurde von Gerd Wohlfahrt ein entsprechendes Strukturmodell auf der Basis der Kristallstruktur erstellt (Beer, *et al.* 1996). Basierend auf diesem Strukturmodell wurden von Scheib *et al*. Untersuchungen zur Stereopräferenz der ROL gegenüber Triacylglycerin Analoga (Abbildung 1.8) durch *Molekular Modelling* durchgeführt (Scheib, *et al.* 1999, Scheib, *et al.* 1998). Durch diese Studien war es möglich Mutanten mit geänderter Stereo-selektivität gegenüber dem Wildtyp vorherzusagen, die auch experimentell bestätigt wurden. Dabei wurde die signifikante Rolle der Aminosäure L258 deutlich.

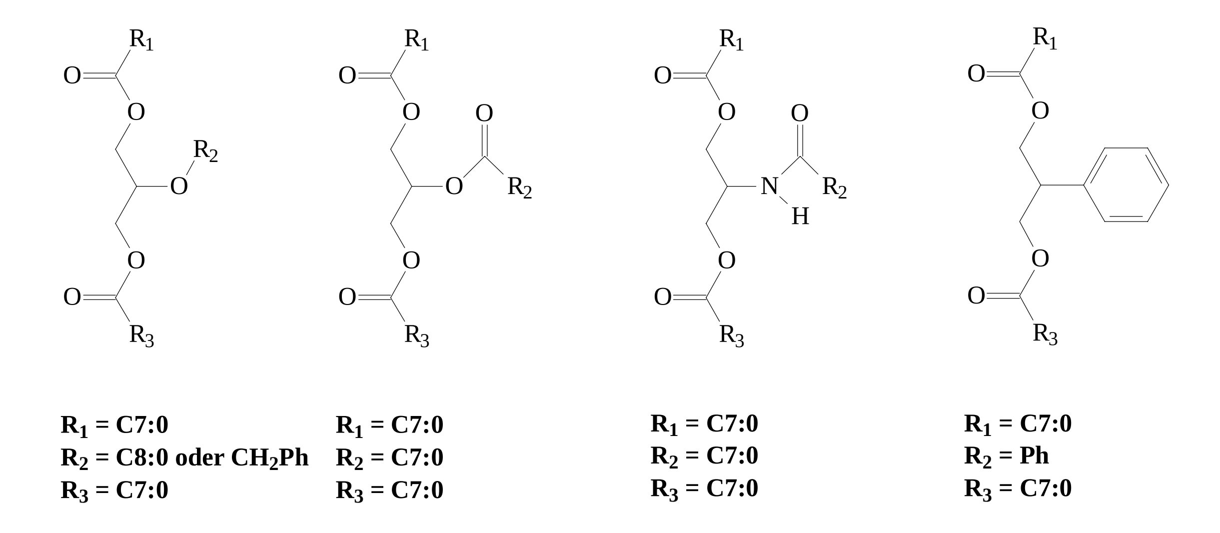

Abbildung 1.8: Einige Beispiele der von Scheib *et al.* zur Bestimmung der Stereoselektivität der ROL untersuchten Substrate.

Folglich wurden von Scheib *et al.* der Austausch von L258 gegen das kleinere Alanin, das kleinere und polare Serin und das größere Phenylalanin vorgeschlagen. Diese Mutanten wurden von Scheib *et al.* in *E. coli* exprimiert und auf ihre Eigenschaften bei der Hydrolyse der Triacylglycerin Analoga untersucht (für eine detaillierte Beschreibung des *Molecular Modellings*, der Produktion der Mutanten und deren Umsetzung siehe (Scheib, *et al.* 1999, Scheib, *et al.* 1998).

1.1.5.3 Klonierung und Expression von *Rhizopus* Lipasen

Einige Lipasen aus *Rhizopus* sp. sind kommerziell erhältlich, wie beispielsweise die von *Rhizopus niveus* (Amano N), *Rhizopus delemar* (Amano D) und *Rhizopus javanicus* (Amano J). Diese Präparationen enthalten aber häufig einen Lipasegehalt von weniger als 5 %. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit verschiedene Lipase-Gene von Vertretern der *Rhizopus sp.* Familie in einen heterologen Wirt kloniert (siehe Tabelle 1.1). Dabei stellte es sich heraus, daß alle bisher untersuchten Lipasen dieser Familie als PrePro-Enzyme vorliegen. Das Auftreten einer Pro-Sequenz ist bei mikrobiellen Lipasen unüblich, tritt jedoch bei allen bisher untersuchten Lipasen aus der Familie der *Mucorales* auf. Sie scheint mindestens zwei Funktionen zu besitzen.

Erstens scheint es so, daß die Pro-Sequenz als Zymogen wirkt, also die Zelle vor der schädigenden Wirkung des aktiven Enzyms schützt, im Fall der ROL möglicherweise vor deren Phospholipaseaktivität. Untypisch für ein Zymogen ist jedoch, daß auch die Pro-Lipase Lipaseaktivität besitzt (Beer, *et al.* 1996). Bemerkenswert ist außerdem, daß die Pro-Lipase völlig andere Eigenschaften zeigt, als die reife Lipase. Neben physikalischen Eigenschaften, wie dem isoelektrischen Punkt und dem Schmelzpunkt unterscheiden sich z. B. die pH-Optima um 0,5 Einheiten, außerdem unterscheidet sich das pH-Profil deutlich. Bei der ProROL fällt die Aktivität in der Nähe des Optimums gegenüber der ROL wesentlich steiler ab (Beer, *et al.* 1998, Beer *et al.*, 1994). Bei der Temperaturstabilität verhält es sich genau umgekehrt, hier fällt die Aktivität der ROL sehr viel stärker ab, als die der ProROL.

Zweitens scheint die Pro-Sequenz eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung zu spielen, hierbei insbesondere bei der korrekten Faltung der Disulfidbrücken.

Klone aus der cDNA Bank von *Rhizopus delemar* und *Rhizopus oryzae*, exprimiert in *Escherichia coli*, zeigten eine schwache Lipaseaktivität auf Tributyrin-Platten. Genauere Untersuchungen mit SDS-PAGE und Immunoblotting zeigten jedoch zwei Banden, die der

PrePro- und der Pro-Lipase zugeordnet werden konnten. Eine vollständige Prozessierung des PrePro-Enzyms in *E. coli* findet folglich nicht statt.

Mit der Klonierung der reifen Lipase in *E. coli* unter die Kontrolle starker Promotoren konnte eine gute Expressionsleistung erreicht werden. ROL in größerer Menge kann jedoch aufgrund der Bildung inaktiver Einschlußverbindungen, die erst in einem teuren und zeitaufwendigen Rückfaltungsprotokoll *in vitro* renaturiert werden müssen (siehe auch Kapitel 5.5.2.3), so nicht hergestellt werden.

Parallel zu dieser Arbeit wurde die Expression der ROL in *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle der Promotor-Region der Isocitrat-Lyase Genes aus *Candida tropicalis* untersucht. Es konnte die ProROL (368 Aminosäuren (AS); Molmasse: 46 kDa) und die Lipase mit verkürzter Pro-Sequenz (299 statt 368 AS; Molmasse 35 kDa) in einem Gemisch erfolgreich exprimiert und sekretiert werden. Dieses Gemisch entstand durch die unvollständige Prozessierung der Prosequenz durch *Saccharomyces cerevisiae*. Die Expression und Sekretion der reifen Lipase (271 AS, Molmasse 30 kDa) mit diesem System gelang jedoch nicht (Takahashi, *et al.* 1998).

Tabelle 1.1: Klonierte *Rhizopus sp.* Lipasen

Lipase	Herkunft	Wirt	Literatur
RDL	cDNA	*E. coli*	(Haas, *et al.* 1991)
ROL, proROL, PreProROL	cDNA	*E. coli*	(Beer, *et al.* 1998)
ProROL	(Beer, *et al.* 1998)	*S. cerevisiae*	(Takahashi, *et al.* 1998)
RNL	mRNA	*E. coli*	(Kugimiya, *et al.* 1992)

1.1.5.4 Verwendung von *Rhizopus* sp. Lipasen

1.1.5.4.1 Modifikation von Triacylglyceriden

Die Lipasen von *Rhizopus* sp. zeigen eine strikte 1,3-Regioselektivität (Berger und Schneider 1991, Waldinger und Schneider 1996) in unpolaren organischen Lösungsmitteln (geringe Acyl-Wanderung; siehe Abbildung 1.4). RDL (Amano D) spaltet beispielsweise den Ester der 1-Position eines Triacylglycerins 76 mal schneller, als den an der 2-Position. Im Vergleich dazu spaltet die moderat selektive Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RML) dieselbe Position nur 11 mal schneller. Eine detailliertere Übersicht über die Spaltung von Triglyceriden bzw. die

Synthese von 1-, 2- oder 3-Monoacylglyceriden (1-, 2-, oder 3-MAG) findet sich in Tabelle 1.2 und in der Literatur (Bornscheuer, *et al.* , Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

1.1.5.4.2 *Rhizopus sp.* Lipasen in der organischen Synthese

Die meisten Lipasen zeigen eine gute Stabilität in organischen Lösungsmitteln und werden aus diesem Grund für die enantiomerenreine Synthese von chiralen Estern, Säuren und Alkoholen eingesetzt (Bornscheuer und Kazlauskas 1999, Kazlauskas und Bornscheuer 1998, Schmid und Verger 1998). Es gibt auf diesem Gebiet allerdings nur wenige Beispiele für Lipasen aus *Rhizopus sp.*. Einige davon sind in Abbildung 1.9 zusammengefaßt.

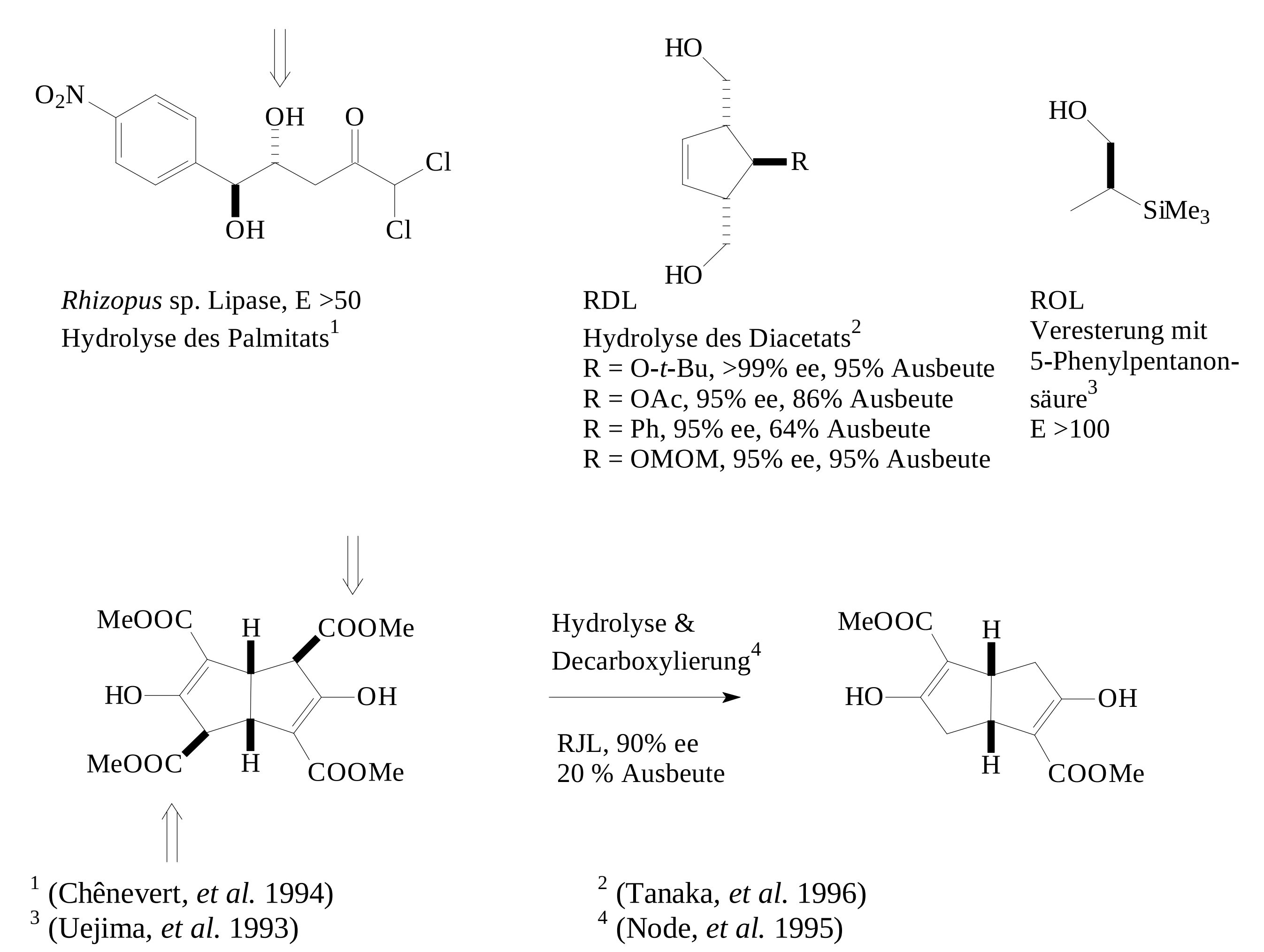

Abbildung 1.9: Einige Beispiele für den Einsatz von *Rhizopus sp.* Lipasen in der organischen Synthese.

Tabelle 1.2: Einsatz von *Rhizopus sp.* Lipasen zur Spaltung und Synthese von Glyceridestern

Lipase	Edukte	Produkte	Literatur
RAL[1)]	Sheaöl – Stearin-, Myristin-säure	Strukturierte Triglyceride des MLM[5)]-Typs	(Wisdom, *et al.* 1987)
RAL[1)]	Palmöl – Stearinsäure	Strukturierte Triglyceride des MLM[5)]-Typs	(Mojovic, *et al.* 1994)
RAL[1)]	Capronsäureethylester-Glycerin	1,3-DAG[6)]	(Millqvist-Fureby, *et al.* 1996)
RAL[1)]	Kastoröl-Wasser	MAG[7)]	(Flenker und Spener 1990)
RAL[1)]	Tripalmitin-Ethanol	2-MAG[7)]	(Millqvist, *et al.* 1994)
RAL[1)]	Palmöl-Glycerin	MAG[7)]	(Holmberg, *et al.* 1989)
RAL[1)]	Ölsäure-Glycerin	MAG[7)]	(Gancet 1990)
RDL[2)]	Olivenöl – Stearinsäure	Kakaobutter Analog	(Yokozeki, *et al.* 1982)
RDL[2)]	Safloröl, Leinsamenöl-Caprylsäure	Strukturierte Triglyceride des MLM[5)]-Typs	(Shimada, *et al.* 1996)
RDL[2)]	Thunfischöl-Caprylsäure	Strukturierte Triglyceride des MLM[5)]-Typs	(Shimada, *et al.* 1996)
RDL[2)]	Vinylcaprylat-Glycerin	1,3-DAG[6)]	(Berger, *et al.* 1992)
RDL[2)]	Palmöl-Wasser	2-MAG[7)]	(Holmberg und Österberg 1988)
RDL[2)]	Laurinsäure/Ölsäure-Glycerin	MAG[7)]	(Hayes und Gulari 1991, Hayes und Gulari 1992, Hayes 1994)
RDL[2)]	Ölsäure-Glycerin	MAG[7)]	(Tsujisaka, *et al.* 1977)
RDL[2)]	Palmitinsäure-Glycerin	MAG[7)]	(Kwon, *et al.* 1995)
RDL[2)], RJL[3)]	1. Triglycerid – Ethanol 2. 2-MAG – Caprylsäure	1. 2-MAG[7)] 2. Triglyceride des MLM[5)]-typs	(Soumanou, *et al.* 1997)
RJL[3)]	Tripalmitin-Stearinsäure	Strukturierte Triglyceride (PPS[8)] und SSP[9)])	(Basheer, *et al.* 1995) auch: (Mogi und Nakajima 1996)
RJL[3)]	Palmitinsäure-Glycerin	1,3-DAG	(Weiss 1990)
RNL[4)]	Butterfett	MAG[7)] (C18:1) In *sn*2 Position	(Kermasha, *et al.* 1995)
RNL[4)]	Lebertran	1(3)-MAG[7)] mit 29 % mehrfach ungesättigten Fettsäuren	(Yadwad, *et al.* 1991)
RNL[4)]	Verschiedene ungesättigte und Hydroxysäuren-Glycerin	MAG[7)]/DAG[6)]	(Waldinger 1996)
ROL[5)]	Milchfett-Ölsäure	Milchfett mit verringertem Palmitin-säuregehalt	(Oba und Witholt 1994)

[1)] Lipase aus *Rhizopus arrhizus*
[2)] Lipase aus *Rhizopus delemar*
[3)] Lipase aus *Rhizopus javanicus*
[4)] Lipase aus *Rhizopus niveus*
[5)] Lipase aus *Rhizopus oryzae*
[6)] Diacylglycerid
[7)] Monoacylglycerid
[8)] Palmitoyl-Palmitoyl-Stearylglycerid
[9)]Stearyl-Stearyl-Palmitoylglycerid

1.1.5.4.3 *Rhizopus sp.* Lipasen in der Schutzgruppenchemie

Lipasen werden häufig in der Schutzgruppenchemie für Kohlenhydrate eingesetzt, da verschiedene Lipasen häufig eine unterschiedliche Regioselektivität aufweisen (Review: (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Ebenso wurden Lipasen erfolgreich für die Darstellung von Zuckerestern zur Verwendung als biologisch abbaubarer Tenside verwendet, indem z. B. Glukose mit langkettigen Fettsäuren verestert wurde (Cao, *et al.* 1998, Cao, *et al.* 1999). Aus der Familie *Rhizopus* sind dafür nur wenige Anwendungen bekannt, während die Lipase aus *Rhizomucor miehei*, die eine 55 %ige Homologie zu ROL aufweist, in diesem Bereich häufig eingesetzt wird (Review: (Bornscheuer und Kazlauskas 1999)).

Boc-Ser-Thr-Oheptyl

Boc-Val-Ala-OCH_2CH_2-Br

Boc-Val-Phe-O (N-Morpholin)ethyl

Cbz-Thr-Al-Oheptyl

Cbz-Ser-Phe-OCH_2CH_2Br

Aloc-Met-Gly-Oheptyl

Boc-Val-Phe-O–(CH₂)₂–O–(CH₂)₂–OMe

(bei pH 7; 37 °C und 9% Aceton; Ausbeuten: 84-97 %)

Abbildung 1.10: Variation geschützter Peptide, die mit ROL (Amano N) gespalten wurden.

Die Entschützung von mit Heptanol veresterten Peptiden konnte jedoch mit Lipasen aus der Familie *Rhizopus sp.*, insbesondere mit der aus *Rhizopus oryzae* (Amano N) erfolgreich durchgeführt werden. Falls das Peptid stark hydrophil oder sterisch gehindert war, wurden erfolgreich Varianten mit 2-Bromethylestern oder 2-(N-Morpholin)ethylester bzw. 2-[2-(Methoxy)ethoxy]ethylester (MEE) verwendet (Braun, *et al.* 1992, Braun, *et al.* 1990, Braun, *et al.* 1991, Eberling, *et al.* 1996, Kunz, *et al.* 1994). Die Ausbeuten mit ROL in Puffer lagen zwischen 84-97 % (pH 7; 37 °C und 9% Aceton) (siehe Abbildung 1.10). Die Schutzgruppen Boc, Cbz und Aloc zur Schützung der Aminogruppe wurden dabei nicht angegriffen.

1.2 Expressionssysteme

1.2.1 Allgemeines

Seit Mitte der achtziger Jahre wurde das Verständnis der Genexpression ständig erweitert. Schlüssel-Parameter war vor allem die Konstruktion einer großen Anzahl verschiedener Vektoren, die in den verschiedenen Expressionsorganismen eingesetzt werden können. Trotzdem konnte bisher noch kein Universalexpressionssystem gefunden werden. Die Entscheidung, welches Expressionssystem für welches Problem geeignet ist, verlangt eine genaue Abwägung der Rahmenbedingungen, wie z. B. erwartete Ausbeute an Protein, Verwendungszweck des Proteins, zur Verfügung stehende Zeit - sowohl für die anfallenden Klonierungsschritte als auch bei der folgenden Kultivierung - sowie den Bedarf an posttranslationalen Modifikationen. Auch wenn in der Regel Standard-Prozeduren zur Kultivierung der gängigsten Expressionssysteme veröffentlicht sind, verlangt die optimale Expression verschiedener Proteine häufig eine Modifikation der Kultivierungsbedingungen. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die Charakteristika verschiedener Expressionssysteme .

Neben der heterologen Genexpression in Prokaryoten wie *E. coli* nimmt die Bedeutung der eukaryotischen Expressionssysteme wie Hefen und Pilzen zur Herstellung von heterologen Proteinen in großem Maßstab stark zu. Insbesondere die *in vivo* Faltung, proteolytische Aufarbeitung, die Möglichkeit der Sekretion, sowie die posttranslationalen Modifikationen machen die Expression in Eukaryoten wie *S. cerevisiae* attraktiv. Die Anwendung der Bäckerhefe wird jedoch häufig durch geringere Ausbeuten, bzw. die längere Kultivierungsdauer gegenüber Prokaryoten limitiert.

Dadurch gewinnen neben den klassischen eukaryotischen Expressionssystemen (*Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*) die "exotischeren" Hefen an Bedeutung. Hier sind insbesondere die methylotrophen Hefen, wie *Pichia pastoris, Hansenula polymorpha* oder auch *Candida boidinii* zu nennen. Diese vereinigen die o. g. Vorteile eines "konventionellen" eukaryotischen Expressionssystems, erreichen aber häufig Expressionsleistungen, die mit einem prokaryotischen Expressionssystem vergleichbar sind.

Tabelle 1.3: Eigenschaften verschiedener Expressionssysteme

Eigenschaft	Bakterien	Hefen und Pilze	Insektenzellen	Säugerzellen
Zell-Wachstum	schnell	mittel-schnell	langsam	langsam
Kultivierung in Schüttelkultur/ Bioreaktor	ja/ja	ja/ja	ja/ja	nein/ja
Minimal Medien	möglich	möglich	nicht möglich	nicht möglich
Kosten für Medien	niedrig	niedrig	hoch	hoch
Expressionslevel	hoch	niedrig-hoch	niedrig-hoch	niedrig-mittel
Sekretion ins Medium	nein (nur ins Periplasma)	ja	ja	ja
Proteinfaltung	normalerweise *in vitro* Refolding	in der Regel richtige Faltung	richtige Faltung	richtige Faltung
N-Glykosylierung	nein	ja, Mannose	ja, aber keine Sialinsäure	ja, komplex
O-Glykosylierung	nein	ja	ja	ja
Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung	nein	nein	ja	ja

1.2.2 Verwendung von *Pichia pastoris* als Expressionssystem

1.2.2.1 Entwicklung von *Pichia pastoris* zu einem Expressionssystem für heterologe Proteine

Die von Philipps Petroleum entwickelte Hefe *Pichia pastoris* sollte ursprünglich für die Produktion von *single-cell* Protein eingesetzt werden (Wegner 1983). Trotz beachtlicher Wachstumsraten von 10 g l^{-1} h^{-1}, Ausbeuten bis zu 130 g l^{-1} Trockenzellen in der Fermentationsbrühe und dem geringen Preis von 5 $ pro kg Protein (Stand 1983) konnte sich das System wirtschaftlich nicht gegen den Einsatz von Sojabohnen durchsetzen. Aus diesem Grunde wurde die Hefe zum Expressionssystem für heterologe Proteine weiterentwickelt (Cregg 1999, Cregg, *et al.* 1993, Romanos, *et al.* 1992, Sreekrishna und Kropp 1996).

Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* kann mit Methanol als einziger C-Quelle überleben. Damit verbunden ist die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd in der Zelle. Diese Reaktion findet in einer speziellen Zellorganelle, dem Peroxisom statt und wird von einer Alkoholoxidase (AOX1) katalysiert. Die Affinität von AOX1 zu Methanol ist nur schwach ausgeprägt, zur Kompensation muß die Hefe das Enzym in großen Mengen produzieren. AOX1 ist bei Verfügbarkeit von z. B. Glycerin oder Glukose nur marginal in der Zelle vorhanden, kann jedoch mit Methanol als einziger C-Quelle bis zu 30 % des Gesamtzell-Proteins ausmachen (Sreekrishna und Kropp 1996). Deshalb wurde der Promotor, der die Expression dieses Enzyms reguliert, verwendet, um heterologe Proteine zu exprimieren.
Zusätzlich zu Vektoren, die auf dem induzierbaren AOX Promotor basieren,wurde auch ein konstitutiver Vektor mit dem Promotor der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) entwickelt (Waterham, *et al.* 1997). Eine Diskussion der Vor- und Nachteile der beiden Promotoren für die Produktion von ROL findet sich in den Kapiteln 2.1.2 und 2.1.3.

Alle zur heterologen Expression verwendeten *Pichia pastoris* Stämme leiten sich von einem Stamm (NRRL Y-11430) ab (Reviewed in: (Cregg 1999, Higgins und Cregg 1998)). In der Vergangenheit wurde am häufigsten der Stamm GS115 verwendet. Dieser auxotrophe Stamm wurde durch die Deletion des für die Histidinoldehydrogenase kodierenden Gens aus dem His4 Locus hergestellt, d. h. durch Unterbrechung der Histidin Biosynthese kann er auf Mangelmedium nur durch die Zugabe von Histidin kultiviert werden. Die Expressions-

vektoren, in die das zu exprimierende Gen kloniert wird, enthalten das für die Histidinoldehydrogenase kodierende Gen. Nach der Transformation des Plasmids in *Pichia pastoris* und Integration in den His4 Locus der Hefe wird der Biosyntheseweg für Histidin wiederhergestellt, die Klone können auf Mangelmedium ohne Zugabe von Histidin wachsen. Durch Ausplattieren der Transformationsansätze auf Platten auf Minimalmedium-Platten ohne Histidin kann also ein transformierter Klon von nichttransformierten unterschieden werden. Alle zur Expression von *Pichia* verwendeten Vektoren sind sogenannte Schaukelvektoren für die Hefe und *E. coli*. Dies ermöglicht Durchführung der Klonierungsarbeiten in dem einfach zu handhabenden prokaryotischen Wirt *E. coli*. Da hierfür jedoch ebenfalls ein Markergen, in der Regel die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin in die Plasmide eingeführt werden mußte, sind diese Vektoren relativ groß. Durch die Entdeckung des in Pro- wie Eukaryoten exprimierbaren Resistenzgens aus *Streptoalloteichus hindustanus* (Sh ble) gegen Zeocin™, einen Vertreter der Familie der Bleomycine, welcher sowohl für Pro- wie Eucaryoten letal wirkt, konnte ein kleineres Plasmid zur Proteinexpression entwickelt werden. Dies machte die Verwendung des auxotrophen Stammes GS115 überflüssig. So wird für die Expression mit Plasmiden, die das Resitenzgen gegen Zeocin™ enthalten häufig der prototrophe Stamm X-33 verwendet.

Alle bisher entwickelten Expressionsplasmide sind in diversen Übersichtsartikeln beschrieben (Cregg, *et al.* 1993, Higgins und Cregg 1998, Shen, *et al.* 1998, Sreekrishna, *et al.* 1997, Sreekrishna undKropp 1996), es werden deshalb nur die in dieser Arbeit verwendeten Systeme im Detail an anderer Stelle diskutiert (siehe Kapitel 2.1.1).

1.2.2.2 Protein-Produktion in *Pichia pastoris*

Seit der Kommerzialisierung von *Pichia pastoris* als Expressionssystem wurde eine ganze Reihe verschiedener Proteine und Enzyme aus verschiedenen Organismen wie Bakterien, Pilzen, Wirbellosen, Säugetieren und Menschen erfolgreich in *Pichia pastoris* kloniert und exprimiert. Beispiele hierfür sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

Tabelle 1.4: Einige Beispiele für die heterologe Genexpression in *Pichia pastoris*

Organismus	Protein	Sekretion	Referenz
Escherichia	β-Lactamase	Nein	(Waterham, *et al.* 1997)
Streptomyces	Streptokinase	Nein	(Hagenson, *et al.* 1989)
Bacillus	D-Alanin Carboxy-peptidase	Ja	(Despreaux und Manning 1993)
Candida	β-Glucosidase	Ja	(Skory, *et al.* 1996)
Saccharomyces	Invertase	Ja	(Tschopp, *et al.* 1987)
Arabidopsis	Nitratreduktase	Nein	(Su, *et al.* 1996)
Kaffeebohne	α-Galactosidase	Ja	(Zhu, *et al.* 1995)
Qualle	GFP	Nein	(Monosov, *et al.* 1996)
Blutegel	Hirudin	Ja	(Rosenfeld, *et al.* 1996)
Ratte	Carnithin-Palmitoyl-transferase	Nein	(de Vries, *et al.* 1997)
Ziege	Interferon-τ	Ja	(van Heeke, *et al.* 1996)
Mensch	Hepatitis B Oberflächen-antigen	Nein	(Cregg, *et al.* 1987)
Mensch	Interleukin-6	Ja	(Vollmer, *et al.* 1996)

Darüber hinaus wurden bereits erfolgreich Lipasen in *Pichia pastoris* exprimiert, wie z. B. Lipase aus *Geotrichum candidum* (Lip A und LipB) (Catoni, *et al.* 1997, Holmquist, *et al.* 1997, Holmquist, *et al.* 1997), *Candida rugosa* (Lip1) (Brocca, *et al.* 1998) und die humane Gallensalzabhängige Lipase (Sahasrabudhe, *et al.* 1998) erfolgreich in *Pichia pastoris* exprimiert.

1.3 Proteinreinigung

1.3.1 Konventionelle Proteinreinigungsmethoden

Die Proteinreinigung ist heute ein weit gefächertes Gebiet. Die Grundlagen sind in verschiedenen Lehrbüchern erklärt und zusammengefaßt und können in diesem Rahmen nicht diskutiert werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Proteinaufreinigungsmethoden verwendet, insbesondere chromatographische Techniken wie Ionenaustauschchromatographie oder Trennung auf Grund hydrophober Wechselwirkungen. Allen Techniken gemein ist, daß sie allgemeine Proteineigenschaften zur Trennung der Proteine verwenden. Häufig sind dann aber verschiedene Reinigungsschritte nötig, da verschiedene Proteine in einzelnen Eigenschaften, z. B. ihrer Hydrophobizität, ein gleiches Verhalten zeigen können. Aus diesem Grund wurde die Affinitätschromatographie entwickelt (siehe 1.3.2). In dieser wird eine spezifische Eigenschaft eines Proteins ausgenützt, z. B. die Bindung eines Antikörpers an ein Hapten oder ein Antigen. Auf diese spezielle Art der Chromatographie soll etwas genauer eingegangen werden.

1.3.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie entstand in den Jahren zwischen 1960 und 1970 (Scopes 1993). Ursprünglich basierte sie auf der Immobilisierung des Substrates eines Enzyms an das dieses durch spezifische Wechselwirkungen band. Seither sind eine ganze Reihe verschiedener Aufreinigungsmethoden entwickelt worden, z. B. durch den Einsatz von Antikörpern. Allen gemein war ursprünglich, daß sie eine biospezifische Wechselwirkung zur Bindung nutzen.

Der Begriff Affinitätschromatographie hat sich aber auch auf eine ganze Reihe anderer chromatographischer Methoden wie z. B. die Metallaffinitätschromatographie ausgedehnt, die nicht oder nur wenig auf biospezifischen Wirkungen basiert. Heute repräsentiert dieser Begriff alle Arten von spezifischen Wechselwirkungen bei der Chromatographie.

1.3.2.1 IMAC

Die Metallaffinitätschromatography (engl.: Immobilized Metal Affinity Chromatography; IMAC) ist eine effektive Methode, um ein Protein oder Peptidfragment in wenigen Schritten, manchmal nur einem, aufzureinigen.

Beladen der Chelat-Sepharose mit Ni^{2+}-Ionen

Bindung des mit einem Tag versehenen Proteins an die immobilisierten Ni^{2+}-Ionen.

Verdrängung des gebundenen Proteins durch einen Überschuß Imidazol.

Regeneration der Chelat-Sepharose durch EDTA

Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf einer IMAC Reinigung mit "Chelating Sepharose" von Pharmacia.

Die Metallaffinitätschromatographie basiert auf der reversiblen Bindung von Metallionen (meist Cu^{2+}, Ni^{2+} oder Zn^{2+}) an eine Matrix. Dabei müssen einige Koordinationsstellen des Metalls unbesetzt bleiben. An diese unbesetzten Koordinationsstellen können Proteine, durch frei zugängliche Histidin-, aber auch Tryptophan- oder Cystein-Gruppen oder die α-Aminogruppe binden. Neben dieser unspezifischen Bindung von frei zugänglichen Aminosäuren besitzen eine Reihe von natürlich vorkommenden Proteinen eine frei zugängliche Metallbindungsstelle. Diese binden in der Regel stärker an die immobilisierten Metallzentren, d. h. sie werden bei der Elution mit einem Imidazolgradienten auch erst später eluiert.

In den letzten 10 Jahren wurden eine ganze Anzahl von Peptidsequenzen gefunden, die auf Grund von Metallbindung oder der spezifischen Wechselwirkung mit kleinen Molekülen zur Affinitätsreinigung eingesetzt werden können. Einige dieser Tags sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.3.2.2 Proteinreinigung mit dem HisTag

Der HisTag ist eine Aneinanderreihung von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen (Porath, *et al.* 1975), der auf molekularbiologischem Weg an das zu reinigende Protein angefügt wird. Er ist im Moment wohl der am häufigsten verwendete Tag zur Proteinreinigung und aus diesem Grund häufig schon in kommerzielle Expressionsvektoren integriert. Mit dem HisTag wurden schon eine ganze Reihe auch industriell sehr wichtiger Proteine aufgereinigt, wie z. B. die Reverse Transkriptase von HIV-1 (Le Grice und Gruninger-Leitch 1990), humanes Interleukin-6 (Savino, *et al.* 1994) oder Onkostatin M (Sporeno, *et al.* 1994).
Neben dem His-Tag, der von der Firma Hoffmann-LaRoche patentiert ist, wurden in der neueren Zeit eine ganze Reihe vergleichbarer Tags beschrieben; einige Beispiele dafür sind im Folgenden beschrieben.

1.3.2.3 Andere Tagsysteme

1.3.2.3.1 Hisactophilin

Hisactophilin ist ein histidinreiches Protein von ca. 10 kDa Größe und wurde, mit GFP fusioniert, erfolgreich zur Prozeßkontrolle in *E. coli* Fermentationen eingesetzt (Poppenborg, *et al.* 1997). Im Verlauf dieser Arbeiten konnte auch die Eignung des Hisactophilin Tags für

die Proteinaufreinigung gezeigt werden. Das Fusionsprotein band doppelt so stark an die Ni-NTA-Matrix (Qiagen), verglichen mit demselben Protein fusioniert mit dem His_6-Tag (Flaschel, *et al.* 1998).

1.3.2.3.2 HAT

Der HAT Epitop ist ein natürlich in Hühner Lactatdehydrogenase vorkommendes Polypeptid (19 AS: Lys-Asp-**His**-Leu-Ile-**His**-Asn-Val-**His**-Lys-Glu-**His**-Ala-**His**-Ala-**His**-Asn-Lys) (Chaga, *et al.* 1992, Chaga, *et al.* 1999). Dieser Tag wurde von Clontech insbesondere für ihr Cobalt-bindendes Talon™ Material weiterentwickelt. Da die in diesem Tag enthaltenen Histidine nicht in direkter Nachbarschaft zueinander vorkommen, unterliegen sie nicht dem Patentschutz des His-Tags. Die Ladungsverteilung im HAT-Epitop entspricht eher der natürlichen eines Proteins, als im His-Tag. Aus diesem Grund weisen mit dem HAT-Epitop fusionierte Proteine häufig bessere Löslichkeitseigenschaften auf, als solche, die mit dem His-Tag fusioniert wurden. Zur Detektion der entsprechenden Fusionsproteine werden häufig Antikörper eingesetzt. Die für das HAT Epitop spezifischen Antikörper zeigen auf Grund der "natürlicheren" Aminosäureverteilung häufig bessere Bindungseigenschaften, als die Immunoglobuline, die zur Detektion von Fusionsproteinen mit dem His-Tag eingesetzt werden.

1.3.2.3.3 ThioFusion

Das ThioFusion™ System wurde entwickelt von LaVallie *et al.* (LaVallie, *et al.* 1993) und ist mittlerweile kommerziell in einigen Expressionsvektoren von Invitrogen vorhanden.

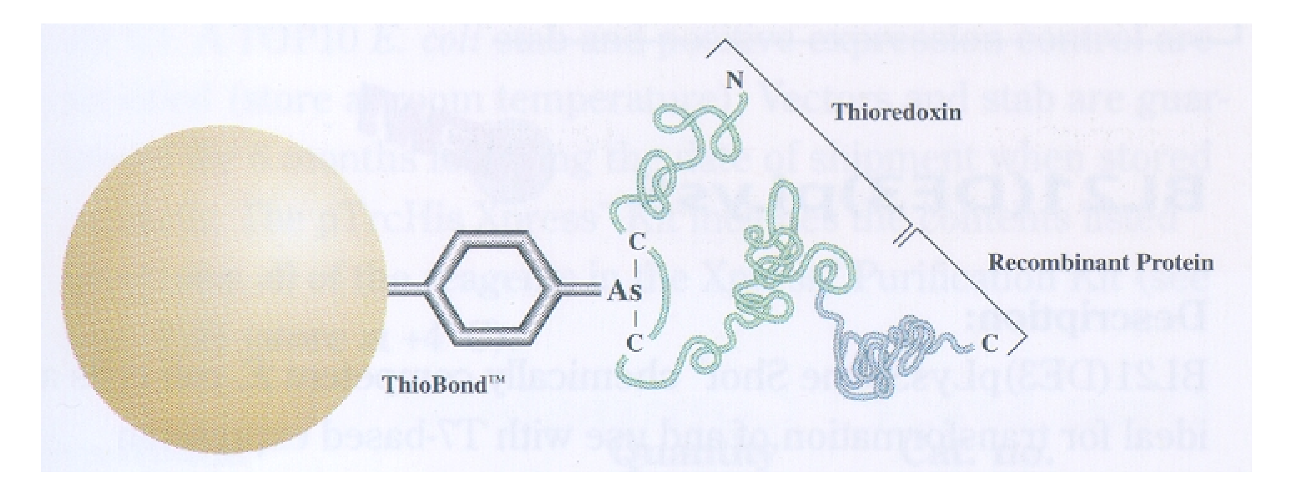

Abbildung 1.12: Bindung des Thioredoxin an ThioBond™ Material (Invitrogen)

Neben der einfachen Aufreinigung mit dem ThioBond™-Material (Invitrogen) (Abbildung 1.12) bietet dieser Tag einige weitere Vorteile, wie erhöhte Löslichkeit des Fusionsprotein, sowie eine verbesserte Thermostabilität und z. T. konnte sogar die Sekretion des Proteins aus *E. coli* durch osmotischen Schock erreicht werden.

1.3.2.4 EGFP als Reporter für die Proteinreinigung

Das *Enhanced Green Fluorescent protein* (EGFP) ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. In dieser ist es dafür verantwortlich die blaue Chemo-Lumineszenz eines weiteren Proteins, des Aequorins, in grün fluoreszierendes Licht zu verwandeln. Die Gensequenz des Proteins konnte kloniert werden (Chalfie, *et al.* 1994, Prasher, *et al.* 1992) und mittlerweile erfolgreich in verschiedenen Organismen wie Bakterien, Hefen, Drosophila, Zebrafisch, Mäusen und anderen Säugerzellen exprimiert werden (Übersicht in: (Yang, *et al.* 1996)). Die Struktur des GFP konnte gelöst werden und offenbarte eine neue Proteinstruktur, die *β-can*. Diese säulenförmige Struktur besteht aus β-Faltblätten an der Außenseite und α-Helices im Inneren, die die Fluorophore im Inneren schützen und fixieren und damit auch die Wellenlängen für das eingestrahlte Licht und die Emission bestimmen (Yang, *et al.* 1996).

1.3.2.5 *Helicobacter pylori* – Ausgangspunkt für die Entwicklung einer TagToolbox

Das spiralförmige Bakterium *Helicobacter pylori* lebt im Magen und dem Duodenum des Magens. Um in der lebensfeindlichen Umgebung der Magensäfte aus Säure und Verdauungsenzymen überleben zu können, bedient sich *Helicobacter* einer ausgereiften Strategie. Er siedelt sich in der Schleimhaut, welche die Magenwände vor dem Einfluß des Magensaftes schützt, ein und erzeugt mit Hilfe einer Urease aus Harnstoff Ammoniumchlorid und Bicarbonat. Beide Substanzen puffern die Mikroumgebung um das Bakterium auf neutrale Werte ab. Der Nachweis der Infektion erfolgt über die Aktivität der Urease. Dem Patienten wird eine kleine Menge ^{13}C oder ^{14}C markierter Harnstoff verabreicht. Wird der Harnstoff von der Urease aus *Helicobacter pylori* gespalten, so befindet sich ^{13}C oder ^{14}C haltiges Kohlendioxid in der Atemluft. Der Nachweis erfolgt über eine Szintillations-Messung bzw. über Massenspektrometrie, weitere Methoden sind der Bluttest auf *H. pylori* Antikörper oder der direkte Nachweis nach einer Biopsie.

In den westlichen Industrieländern sind ca. 50 % der über 60-Jährigen mit dem Bakterium infiziert. In Entwicklungsländern sind es bis zu 90 % der Erwachsenen. *H. pylori* steht im

Verdacht, für die Entstehung von Magengeschwüren und Magenkrebs verantwortlich zu sein und wird deshalb intensiv untersucht. Während die Behandlung von Magengeschwüren früher darauf angelegt war den pH-Wert des Magensaftes zu erhöhen, geht man jetzt erfolgreich dazu über, Magengeschwüre durch die Bekämpfung des Bakterium mit Antibiotika zu behandeln.

Die Urease aus *Helicobacter pylori* ist ein nickel-abhängiges Enzym. Durch die komplette Sequenzierung des *Helicobacter pylori* Genoms (Tomb, *et al.* 1997) konnten verschiedene P-Typ ATPasen identifiziert werden, die im Nickelhaushalt des Bakteriums eine große Rolle zu spielen scheinen. Die Sequenzierung eines für eine ATPase aus *H. pylori* kodierenden Gens ergab eine His- und Cys-reiche Region am N-terminalen Ende des Enzyms mit der Sequenz **His**-Ile-**His**-Asn-Leu-Asp-**Cys**-Pro-Asp-**Cys** (Melchers, *et al.* 1996). Der Cys-reiche Teil wurde auch bei Metallbindungsstellen einer Reihe anderer Enzyme wie z. B. der Cd^{2+}-ATPase von *Staphyococcus aureus* (Nucifora, *et al.* 1989) oder einer ATPase aus *Enterococcus hirae* (Odermatt, *et al.* 1993) gefunden und enthält die Consensus-Sequenz **Cys**xx**Cys**. Durch die Kopplung mit dem N-terminalen Teil (Gly-Met-Thr-**Cys**-x-x-**Cys**) einer ATPase (ATP7B), die eine Rolle bei der Kupferentgiftung spielt (Wilson-Krankheit), wurde erfolgreich eine Gluthathion-S-Transferase durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt (DiDonato, *et al.* 1997). In dieser Arbeit wurde eine eindeutige Präferenz dieser AS-Sequenz für Kupfer festgestellt. Für die Nickelbindungsstelle verschiedener ATPasen aus *Helicobacter pylori* wurde die Consensus-Sequenz **His**-x-**His**-x-x-x-**Cys**-x-x-**Cys** abgeleitet (Bayle, *et al.* 1998). Die Wildtyp-Sequenz (siehe oben) wurde erfolgreich zur Metallaffinitätschromatographie der nativen ATPase (ATPase 439) mit Ni-NTA verwendet (Volz, *et al.* 1998).

1.4 Aufgabenstellung

Die Lipasen aus der Familie *Rhizopus* sind wertvolle Biokatalysatoren, insbesondere in der Fettmodifikation. Dabei entscheidend ist die außerordentlich hohe 1,3-Regioselektivität. Aber auch für die Schützung und Entschützung von Aminosäuren und Zuckern wurden sie erfolgreich eingesetzt.

Die Lipase aus *Rhizopus oryzae* konnte in einer vorangehenden Arbeit in *Escherichia coli* im Labormaßstab hergestellt werden. Um die Lipase in größerer Menge herstellen zu können, ist die Expression in *E. coli* jedoch ungeeignet, da das Protein nur als inaktive Einschlußverbindungen exprimiert wird, die in einem teuren und aufwendigen Rückfaltungsprozeß *in vitro* renaturiert werden müssen.

Zur Expression und Sekretion von korrekt gefalteten Proteinen in größerer Menge bieten sich Hefen an. Das Standard Expressionssystem hierbei ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Heutzutage werden aber auch eine ganze Reihe anderer Hefen zur Expression von Proteinen verwendet, die gegenüber *Saccharomyces* durch eine höhere Expressionsleistung, sowie eine moderatere Glykosylierung im Vorteil sind.

Ziel dieser Arbeit war die Expression der Lipase aus *Rhizopus oryzae* in aktiver Form in der Hefe *Pichia pastoris* zur Bereitstellung dieses wertvollen Biokatalysators für Anwendungen in der Fettmodifikation und Biotransformation. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene auf Computersimulationen basierende Mutanten hergestellt und zur Untersuchung der Regioselektivität gegenüber Triglyceridanaloga und der Enantioselektivität von Reaktionen mit primären und sekundären Alkoholen bereitgestellt.

Durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen sollte eine möglichst hohe Ausbeute an aktivem Protein erzielt werden, aber auch allgemeine Erkenntnisse über die Fermentation dieser Hefe zur optimalen Proteingewinnung erhalten werden. Die Etablierung der Kultivierung in vollsynthetischem Medium sollte die Möglichkeit der Isotopenmarkierung mit entsprechenden N- oder C-Quellen ermöglichen, um damit dynamische Untersuchungen bezüglich ihrer Stereo- oder Regioselektivität zu erlauben.

Der zweite Teil der Arbeit sollte sich mit der Proteinaufreinigung beschäftigen. Es sollte eine Möglichkeit gefunden werden, Proteine einfach - in möglichst einem Schritt - aus Zelllysaten oder Kulturüberständen aufreinigen zu können. Dabei sollte eine verbesserte Alternative zu dem bekannten und durch Patente geschützten His-Tag gefunden werden.

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung und Expression der Lipase aus *Rhizopus oryzae* in *Pichia pastoris*

2.1.1 Klonierung des Gens der reifen ROL in pPICZαA und pGAPZαA

Das für die Lipase aus *Rhizopus oryzae* kodierende Gen wurde von Beer *et al.* (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998) aus einer partiellen Genbank isoliert und in *E. coli* überexprimiert. Der für die Lipase kodierende *open reading frame* (offenes Leseraster, ORF) wurde in den Expressionsvektor pCYTEXP1 unter Kontrolle des, durch Temperaturwechsel induzierbaren λ-Promotors (PRPL) direkt hinter die OmpA-Leadersequenz zur Direktion der Lipase in das Periplasma kloniert. Das entstandene Plasmid (pT1OmpAROL, siehe Abbildung 2.1) enthielt außerdem eine Ampicillin Resistenz zur Selektion positiver Transformanten und zum Verbleib des Plasmids in der Zelle. Dieser Expressionsvektor pT1-OmpAROL (Beer 1994) diente in der vorliegenden Arbeit als Matritze für die PCR Reaktion zur Klonierung und Expression des ROL-Gens in der Hefe *Pichia pastoris*.

Zu diesem Zweck wurden zwei kommerzielle Expressionsvektoren pPICZαA und pGAPZαA (Invitrogen, Ca., siehe Abbildung 2.2) verwendet. Diese beiden Schaukelvektoren, die sowohl in *E. coli*, wie in *Pichia pastoris* transformiert werden können enthalten beide ein Resistenzgen (Shl ble) gegen Zeocin zur Selektion positiver Transformanten, das sowohl in *E. coli* wie in *Pichia pastoris* zur Selektion von positiven Transformanten verwendet werden kann. Ebenfalls in beiden Vektoren vorhanden ist der α-Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, der fusioniert an das Lipasegen auch in *Pichias pastoris* für die Sekretion der Lipase aus der Hefe sorgt.

Die beiden Vektoren unterscheiden sich in dem verwendeten Promotor: Der AOX-Promotor in pPICZαA wird durch die Verwendung von Methanol als C-Quelle induziert, bzw. in Anwesenheit von Glycerin, Glukose u. a. reprimiert. Im Gegensatz dazu wird bei der Verwendung des GAP-Promotors in pGAPZαA das entsprechende Gen konstitutiv exprimiert.

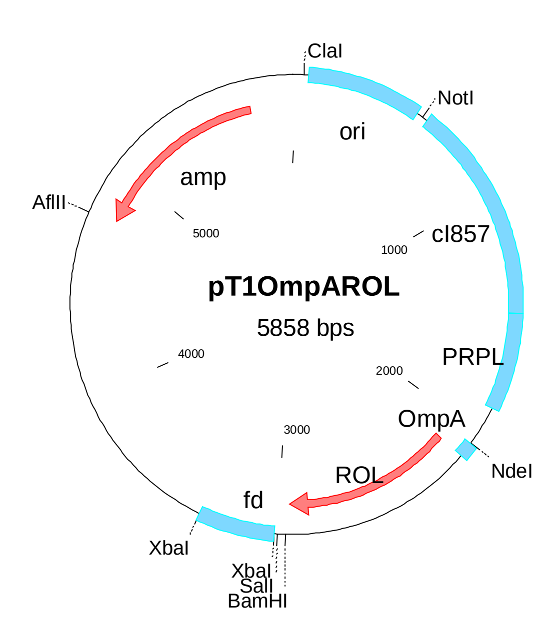

Abbildung 2.1: Expressionsvektor pCYTEXP1 mit dem ROL-Gen.
Das ROL-Gen wurde an die OmpA-Sequenz unter Kontrolle des λ-Promotors (PRPL) fusioniert, wie von Beer *et al*. (Beer, *et al.* 1998) zur Expression der ROL in *E. coli* verwendet.

Zur Expression der ROL wurde das ROL-Gen in beide oben beschriebenen Expressionsvektoren kloniert und in *Pichia pastoris* transformiert. Zur Integration des ROL-Gens *in frame* hinter den α-Faktor der Vektoren wurde dieses aus dem Expressionsvektor pT1OmpAROL mittels einer PCR Reaktion amplifiziert. Dazu wurden zwei flankierende Primer ROL_Eco1 und ROL_Not2 verwendet, die am 5´-Ende des Fragments eine *Eco*RI - und an das 3´-Ende eine *Not*I-Schnittstelle anfügten. Zusätzlich wurden zwei Stop-Codons am 3´-Ende des Gens eingeführt, um die Fusion des Lipase-Gens mit dem auf dem Plasmid vorhandenen His-tag zu verhindern. Das erhaltene 800 bp PCR Fragment wurde mit *Eco*RI und *Not*I verdaut, ebenso wie die Vektoren pPICZαA und pGAPZαA (Abbildung 2.2).

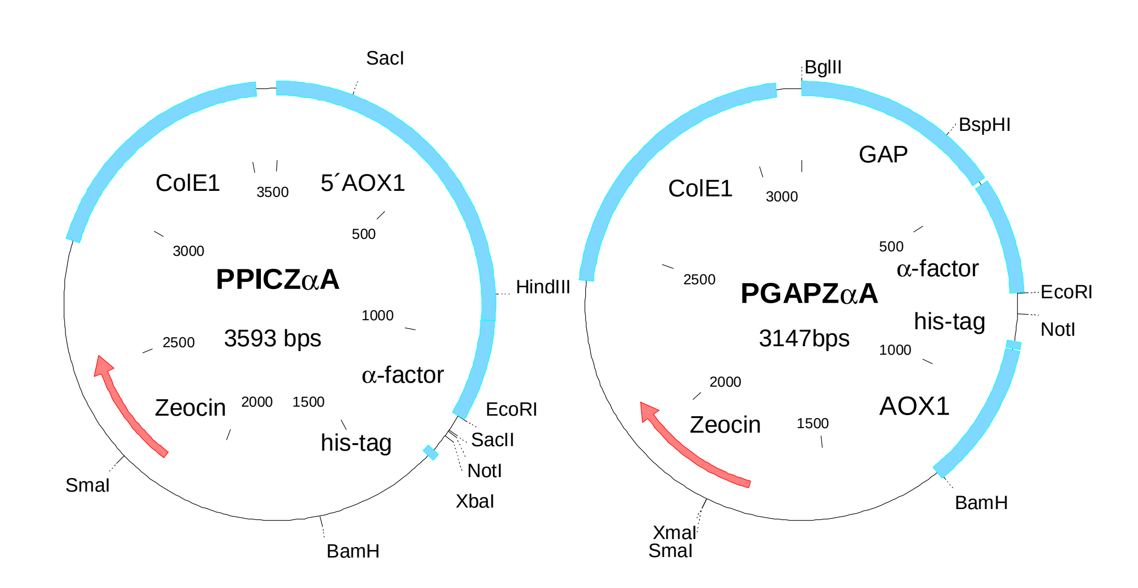

Abbildung 2.2: Schaukelvektoren für *Pichia pastoris* und *E. coli* zur Expression von heterologen Proteinen in *Pichia pastoris*.
Beide Plasmide enthalten das *Shl Ble* Gen (Zeocin-Resitenz) zur Selektion positiver Transformanten gegen das Antibiotikum Zeocin in *E. coli* und *Pichia pastoris*, sowie den α-Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Sekretion der Lipase. Zur Replikation und dem Verbleib des Plasmids in *E. coli* besitzen beide Vektoren eine Region aus dem pUC-Vektor. Sie unterscheiden sich durch die verwendeten Promotoren zur heterologen Genexpression, im Fall pPIC der induzierbare Promotor der Alkoholoxidase I, im Fall von pGAP der konstitutive Promotor der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase.

Die erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und ligiert. Nach der erfolgreichen Transformation in *E. coli* wurden einzelne Klone selektiert und die ROL kodierende Gensequenz ebenso wie deren korrekte Fusion an den α-Faktor aus *S. cerevisiae* durch DNA-Sequenzierung in 5´→ 3´, sowie 3´→ 5´ Richtung überprüft. Je ein fehlerloser Klon wurde ausgewählt (pPICZαA_ROL bzw. pGAPZαA_ROL) und zur Transformation in *Pichia pastoris* verwendet.

2.1.2 Transformation und Expression der ROL in *Pichia pastoris GS 115* (his 4)

Zu Beginn der Arbeit wurde der *Pichia pastoris* Stamm GS115 verwendet. Dieser auxotrophe Stamm wurde durch die Deletion des für die Histidinoldehydrogenase kodierenden Gens aus dem His4 Locus hergestellt, d. h. durch Unterbrechung der Histidin Biosynthese kann er auf synthetischem Mangelmedium nur durch die Zugabe von Histidin kultiviert werden. Durch die Verwendung der Vektoren pPICZαA bzw. pGAPZαA mit dem Resistenzgen gegen Zeocin™ wird jedoch dieses Gens in der Hefe nicht zur Selektion von positiven Transformanten benötigt, verlangt aber den Zusatz von Histidin in synthetischen Medien.
Um die Transformations-Effizienz in *Pichia pastoris* zu erhöhen wurden die Plasmide mit *Sac*I, im Falle von pPICZαA_ROL und *Bsp*HI im Falle von pGAPZαA_ROL, linearisiert und nach der Elektroporationsmethode von Invitrogen (siehe 5.5.2.9) in kompetente GS115 Zellen transformiert.
Transformierte Zellen wurden auf YPDS-Platten mit Zeocin als selektivem Marker ausgestrichen und drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Zeit waren pro Transformations-Ansatz 5-10 Kolonien auf jeder Platte entstanden.
Kolonien, transformiert mit pPICZαA_ROL wurden auf Tributyrin-Minimalmedium (TMM)-Platten (YPD-Medium ohne Glukose) transferiert und auf Ihre Fähigkeit ROL zu bilden untersucht (siehe 2.1.2.1).
Zellen, transformiert mit pGAPZαA_ROL, wurden zur Durchmusterung auf YPD-Platten mit Tributyrin transferiert (siehe Kapitel 2.1.2.3).

2.1.2.1 Durchmusterung verschiedener mit pPICZαA_ROL transformierter Klone auf ihre Fähigkeit ROL zu produzieren

Die selektierten Zeocin-resistenten Kolonien wurden auf die TMM-Platten transferiert. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurde zur Induktion der Lipaseproduktion ein Tropfen Methanol in den Deckel der Petrischale gegeben. Nach 2-3 Tagen, wobei alle 24 h wieder ein Tropfen Methanol zugegeben wurde, bildete sich um die Kolonien unterschiedlich große Höfe von denen jene, welche die größten Höfe zeigten, ausgewählt und in 50 ml BMGY Medium überimpft wurden. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 2-6 wurden die Zellen abzentrifugiert und in derselben Menge BMMY Medium resuspendiert. Das im Medium enthaltene Methanol induzierte die Lipaseexpression. Nach 48 Stunden wurde die Lipaseaktivität im Überstand der einzelnen Kulturen bestimmt.

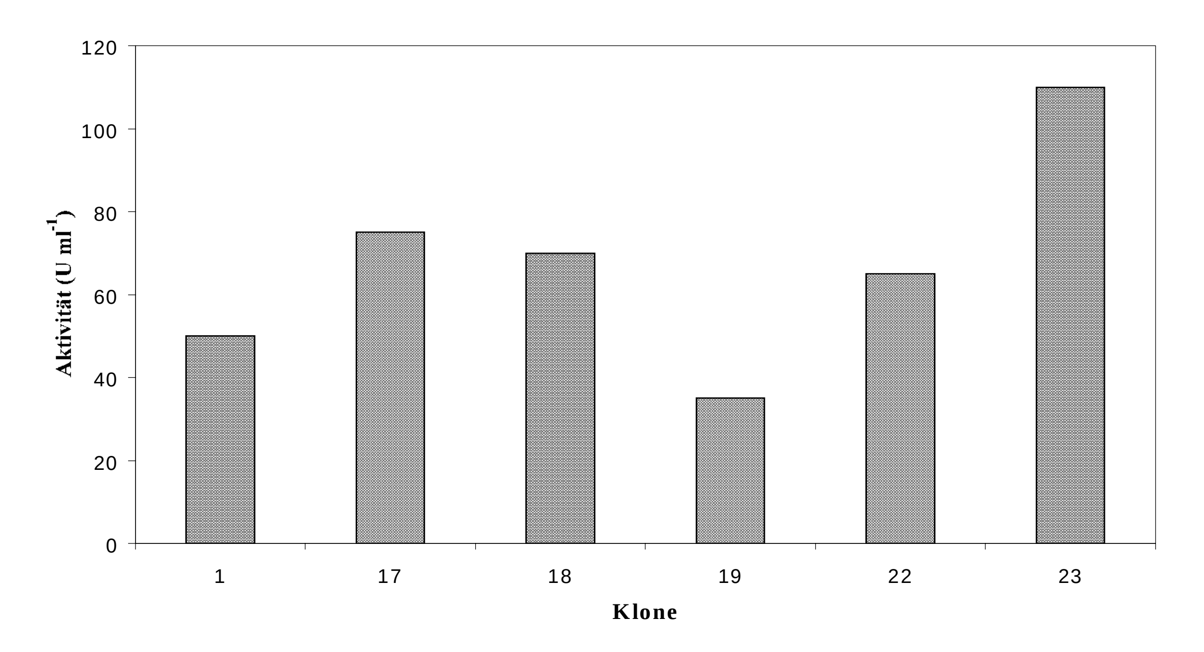

Abbildung 2.3: Relative Lipaseaktivität einzelner *Pichia pastoris* GS115 Klone transformiert mit pPICZαA_ROL.
Die Werte wurden auf eine OD_{600} = 15 bezogen.

Beim Überimpfen der Kolonien blieben eine unterschiedliche Menge der Zellen an der Impföse hängen. So wurde, um die Aktivität vergleichen zu können, angenommen, daß die

Ausbeute an aktiver Lipase im Überstand linear mit der Zellenzahl und damit mit der OD_{600} der Kulturbrühe steigt und so die gemessenen Aktivitäten (Triolein bei 30 °C im pH Stat) auf eine OD_{600} von 15 normiert. Um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, wurden nur Kultivierungen berücksichtigt, die am Ende eine OD_{600} von 15 ± 5 aufwiesen.

In allen Überständen konnte Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Die gemessene Aktivität differierte zwischen den einzelnen Klonen jedoch sehr stark. Klon 23, der Klon mit der höchsten Aktivität (bezogen auf die OD_{600} ; siehe Abbildung 2.4) wurde ausgewählte und im 500 ml Maßstab im Schüttelkolben kultiviert (Lipaseaktivität im Kulturüberstand: 110 U ml^{-1} bzw. spezifischen Aktivität: 13,8 U mg^{-1} (pH Stat, Triolein, 30 °C). ROL aus dieser Kultivierung wurde für die Reinigung, die Charakterisierung und den Vergleich der ROL aus *P. pastoris* mit denen aus anderen Expressionssystemen verwendet (siehe Kapitel 3.4).

2.1.2.2 Bestimmung des Phänotyps verschiedener *Pichia pastoris* Klone transformiert mit pPICZαA_ROL

Der Expressionsvektor pPICZαA_ROL enthält die Promotorsequenz des AOX1 Genes aus *Pichia pastoris*, sowie die Terminationssequenz für den ORF des AOX1 Genes. Durch die Linearisierung des Plasmids zwischen diesen beiden Genabschnitten kann es bei der Rekombination zu einem sogenanten *Double-Crossover* kommen. Bei diesem wird im Gegensatz zum *Single-Crossover* die für die AOX1 kodierende Gensequenz aus dem Genom der Hefe herausrekombiniert, dies führt zum Mut^S-Phänotyp, der eine erhöhte Sensitivität gegenüber Methanol im Vergleich zum Wildtyp (Mut^+) besitzt. Dies rührt daher, daß der Zelle anstatt der stark exprimierten AOX1 nur die schwach exprimierte AOX2 zur Metabolisierung von Methanol zu Verfügung steht. In der Regel entstehen bei der Transformation Mischformen der beiden Phänotypen, die durchaus unterschiedliche Expressionsraten zeigen können. Es wurden zehn verschiedene Klone und der untransformierte Stamm GS115 in 50 ml Kulturen auf ihre Fähigkeit untersucht, auf Methanol zu wachsen. Während der untransformierte Stamm GS115 sowohl in BMGY, als auch in BMMY mit nahezu derselben Geschwindigkeit wuchs, zeigten alle Klone ein deutlich langsameres Wachstum in BMMY gegenüber BMGY. Die Wiederholung dieses Versuches mit zehn Klonen aus der Transformation des *Pichia pastoris* Stammes X-33 ergab das gleiche Ergebnis.

2.1.2.3 Durchmusterung verschiedener Klone transformiert mit pGAPZαA_ROL auf ihre Fähigkeit ROL zu produzieren

Zeocin-resistente, mit dem pGAPZαA_ROL Vektor transformierte Klone, wurden auf YPD-Platten mit Tributyrin transferiert und die Bildung von Halos detektiert. Die Klone, welche die größten Höfe bildeten wurden selektiert und ebenfalls ca. 72 h in YPD Medium kultiviert. Die resultierenden Aktivitäten bei gleicher OD_{600} waren jedoch mit 20-60 U ml^{-1} deutlich geringer, als bei den Konstrukten mit pPIC Vektoren. Trotzdem wurden einige Kultivierungsversuche in Schüttelkolben (500 ml) und Fermentern (5 l) durchgeführt. In diesen konnte jeweils eine große Zellmasse erreicht werden, die Ausbeute an aktiver Lipase ließ sich jedoch nicht steigern. Es konnte in keiner Kultivierung mehr als 60 U ml^{-1} aktive ROL im Kulturüberstand erhalten werden. Aus diesem Grunde wurde die Expression von ROL in *Pichia pastoris* mit dem konstitutiven pGAP Vektor nicht weiter verfolgt.

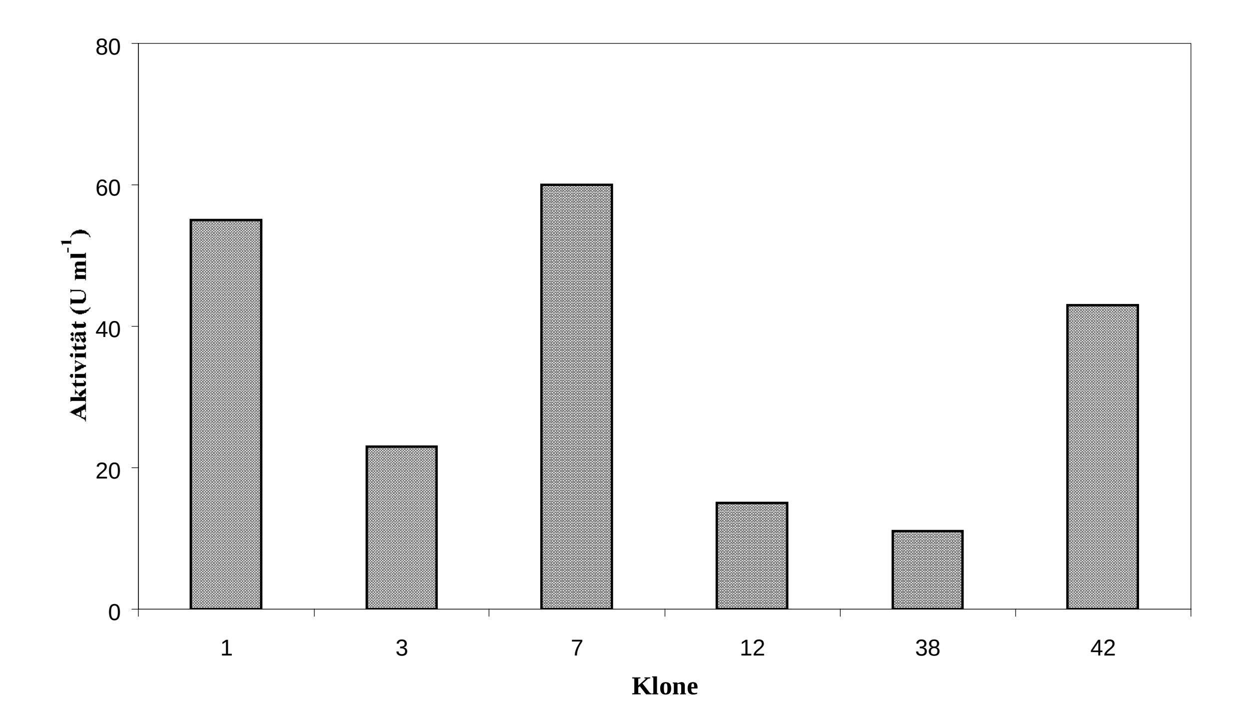

Abbildung 2.4: Relative Lipaseaktivität einzelner *Pichia pastoris* Klone transformiert mit pGAPZαA_ROL.

Die Werte wurden wie in Abbildung 2.3 auf ihre OD_{600} = 15 bezogen.

2.1.3 Transformation und Expression der ROL in *Pichia pastoris* X-33

In dem in Kapitel 2.1.2 verwendeten *Pichia* Stamm GS 115 wurde als Selektionsmarker das his 4 Gen deletiert. Daher muß man, wenn man synthetische Medien verwenden möchte, Histidin zusetzen. Da ein Ziel der Arbeit die Kultivierung von *Pichia pastoris* in synthetischem Medium war, wurde der Vektor pPICZαA_ROL in den Wildtyp-Stamm X-33 transformiert. Hierzu wurden verschieden Transformationsmethoden getestet (siehe auch 2.1.4). Die Selektion verschiedener Klone erfolgte auf dieselbe Weise, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Wieder wurde eine Reihe verschiedener Klone selektiert. Die Expressionsversuche zeigten, daß der Klon pPICZαA_ROL 3-3 die beste Expressionsleistung mit 120 U ml^{-1} bezogen auf eine OD_{600} von 15 erreichte (vgl. Kapitel 2.1.2.1 und 2.1.2.3). Folglich wurde dieser Klon bei den weiterführenden Kultivierungen im Fermenter verwendet.

2.1.4 Vergleich verschiedener Transformationsmethoden zur Transformation von pPICZαA_ROL in *Pichia pastoris* X-33

Da die Transformation von *Pichia pastoris* X-33 durch Elektroporation nach dem Invitrogen Protokoll nur mit einer geringen Anzahl positiver Transformanten durchgeführt werden konnte, wurden verschiedene Transformationsmethoden hinsichtlich ihrer Effizienz, dem experimentellen Aufwand und der Eignung zur Lagerung kompetenter Zellen untersucht.

Die Elektroporation nach dem Invitrogen Protokoll zeigte eine geringe Effizienz mit 5-10 Transformanten pro Ansatz und vor allem die Kultivierung bis zu einer OD_{600} von genau 1,3 warf häufig praktische Probleme auf. So mußten immer mehrere Kulturen angesetzt werden um sicher zu stellen, daß zumindest eine davon die richtige OD_{600} zur Transformation zu einem bestimmten Zeitpunkt hatte. Mit dieser Methode ist es nicht möglich, kompetente Zellen einzufrieren und wieder zu verwenden.

Bei der Transformation mit der LiCl Methode nach einer Variante des Transformationsprotokolls für *Saccharomyces cerevisiae* (Gietz, *et al.* 1995) wurden die Zellen durch die Behandlung mit einer hohen Konzentration LiCl in Gegenwart von PEG zum Schutz der Zellen, kompetent gemacht und durch Hitzeschock transformiert. Die OD_{600} ist bei dieser Methode kein so entscheidender Faktor, wie bei der nach Invitrogen, jedoch ist auch

hier das Ansetzen mehrerer Kulturen empfehlenswert. Der zeitliche Aufwand ist mit dem für die Elektroporation vergleichbar, auch hier ist es nicht möglich, kompetente Zellen zu lagern. Mit dieser Methode konnten in fünf Versuchen keine positiven Transformanten erzeugt werden. Auch die Variante mit LiAc ergab keine Transformanten.

Tabelle 2.1: Vergleich der verschiedenen Transformationsmethoden für *Pichia pastoris* X-33 transformiert mit pPICZα_ROL

Methode	Anzahl Transformanten (Maximal)	Anzahl positiver Transformationen (von fünf)	Lagerung kompetenter Zellen	Aufwand[1])
Elektroporation nach Invitrogen	5-10	5	nein	++
LiCl-Methode	0	0	nein	++
"Easy Comp Kit"	1-4	3	ja	+
Elektroporation vereinfacht	100-200	5	nein	+

[1]) ++ = zeitaufwendig; + = wenig zeitaufwendig

Die dritte Methode zur Transformation ist die Verwendung des "Easy Comp Kits" von Invitrogen. Diese entspricht in seinen Grundzügen der LiCl Transformation, die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen ist jedoch nicht veröffentlicht. In dieser Methode sticht vor allem die Möglichkeit, kompetente Zellen zu lagern, positiv hervor. Dadurch ist es möglich, einmal Zellen in größerem Maßstab bis zu einer OD_{600} von 1,0 zu kultivieren und diese nach dem Einfrieren zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden. Es wurde sogar berichtet, daß die Effizienz nach dem Einfrieren steigen kann (M. Vanetti, Invitrogen, persönliche Mitteilung).

Die letzte verwendete Methode ist eine vereinfachte Variation der Elektroporationsmethode nach Invitrogen. Es wurden zwei Impfösen *Pichia pastoris* Zellen von einer YPD-Platte entnommen und über Nacht in 200 ml YPD Medium in einem 2 l Kolben bei 30 °C kultiviert. Wichtigster Parameter war die OD_{600} vor dem Zentrifugieren. Von dieser hing später das gewählte Volumen für die Resuspendierung ab. Nach mehreren Waschschritten mit Wasser bzw. 1 M Sorbitol wurde das verbleibende Pellet in 1 ml 1 M Sorbitol pro OD_{600} 1,3 resuspendiert und elektroporiert. Die Zellen konnen nach dem Einfrieren nicht mehr erfolgreich transformiert werden. Die Methode ging jedoch sehr schnell und ergab in etwa

200 Transformanten pro Transformationsansatz und damit die höchste Transformationseffizienz.

Tabelle 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der Eigenschaften der verschiedenen Transformationsmethoden für *Pichia pastoris*.

2.1.5 Klonierung, Transformation und Expression von ROL in *Saccharomyces cerevisiae*

In der Regel sind die Expressionraten von heterolog exprimierten Proteinen in *Pichia pastoris* wesentlich höher, als in *Saccharomyces cerevisiae*. Will man *Pichia pastoris* jedoch z. B. für gerichtete Evolution oder Zufallsmutagenese einsetzen, so wird das durch die niedrige Transformationseffizienz und größere Schwierigkeiten bei der Wiederfindung der Gensequenz durch die Integration in das Genom erschwert. Für diese und vergleichbare Anwendungen und den direkten Vergleich der Expressionsrate von *Saccharomyces cerevisiae* mit *Pichia pastoris* wurde die für die native ROL kodierende Gensequenz in den Expressionsvektor für *Saccharomyces cerevisiae* (pYes) kloniert.

Das Plasmid pPICZαROL diente in diesem Fall als Templat für die PCR. Um das ROL Gen inklusive des α-Faktors in den Vektor pYes zu klonieren, wurde der Primer pYes_alpha_bam1 zur Einführung einer BamHI-Schnittstelle am 5´-Ende des α-Faktors und der Primer ROL_Not2 am 3´-Ende des ROL-Genes verwendet. Das mit den entsprechenden Enzymen geschnittene PCR Fragment wurde mit den mit denselben Enzymen geschnitten pYes Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Fünf ampicillin-resistente Klone wurden selektiert und sequenziert, um Fehler bei der PCR bzw. bei der Fusion der Gene auszuschließen. Ein fehlerloser Vektor wurde in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und auf Selektivagar ausplattiert. Fünf Klone wurden in Flüssigmedium überführt und kultiviert, um die Lipase-Expressionsleistung zu untersuchen. Es konnte jedoch im Überstand keine meßbare Aktivität detektiert werden. Im Folgenden wurde der Überstand ultrafiltriert und das Konzentrat nochmals auf Aktivität untersucht. Die gefundene Aktivität lag zwischen 5-10 U ml^{-1}. Da dies weder mit den Ausbeuten in *Pichia pastoris* noch mit denen in *E. coli* konkurrieren kann, wurden die Expressionsversuche mit *S. cerevisiae* eingestellt.

2.2 Fermentation von *Pichia pastoris* zur ROL Produktion

Alle Fermentationsstudien wurden mit dem Klon 3-3 aus dem Wildtyp-Stamm X-33 transformiert mit dem Plasmid pPICZαA_ROL durchgeführt. Ziel der Fermentationen war, eine größere Menge aktiver ROL in einem preisgünstigen Medium herzustellen. Außerdem sollte eine Methode entwickelt werden ROL in vollsynthetischem Medium, zur Isotopenmarkierung des Proteins mit ^{15}N, zu fermentieren. Aus diesem Grund wurde bei der Untersuchung zur Kultivierung in synthetischem Medium ganz bewußt auf die Zugabe von beispielsweise Vitaminen verzichtet. Ein Schritt, der sich natürlich ebenfalls auf die Kosten positiv auswirkt.
Die Aktivitätsbestimmung der Lipase erfolgte im pH Stat (30 °C, pH 8,1; im Fall der Kultivierungen in komplexem Medium mit Triolein, im Fall der Kultivierung in synthetischem Medium mit Olivenöl, dessen Hauptbestandteil Triolein darstellt).

2.2.1 Kultivierung in komplexem Medium mit unmittelbarer Induktion

Die Fermentationsstudien in komplexem Medium wurden in 5 L Fermenter (Infors) durchgeführt. Die Übernachtkultur (BMGY, 1:10 des Fermentervolumens) wurde zentrifugiert und das Zellpellet im selben Volumen BMMY Medium resuspendiert. Mit dieser Kultur wurde der Fermenter angeimpft. Es wurden zwei verschiedene Fütterungsstrategien angewendet. Zunächst wurde alle 24 h 0,5 – 1 % Methanol zugegeben(Abbildung 2.5), daraus resultierte nach 98 h Kultivierung eine Biomasse von 42 g l^{-1}. Die Lipaseaktivität im Überstand nach dieser Zeit betrug 100 U ml^{-1}, was einer Produktivität von 1020 U l^{-1} h^{-1} entspricht. Durch eine verbesserte Fütterungsstrategie, in der die Fütterungspulse von dem im Abgas gemessenen CO_2-Wert abhängig gemacht wurden, konnte die Produktivität auf 1840 U l^{-1} h^{-1} gesteigert werden (Abbildung 2.6). Dies entspricht einer Aktivität von 180 U ml^{-1} nach einer Kultivierungsdauer von 89 h.

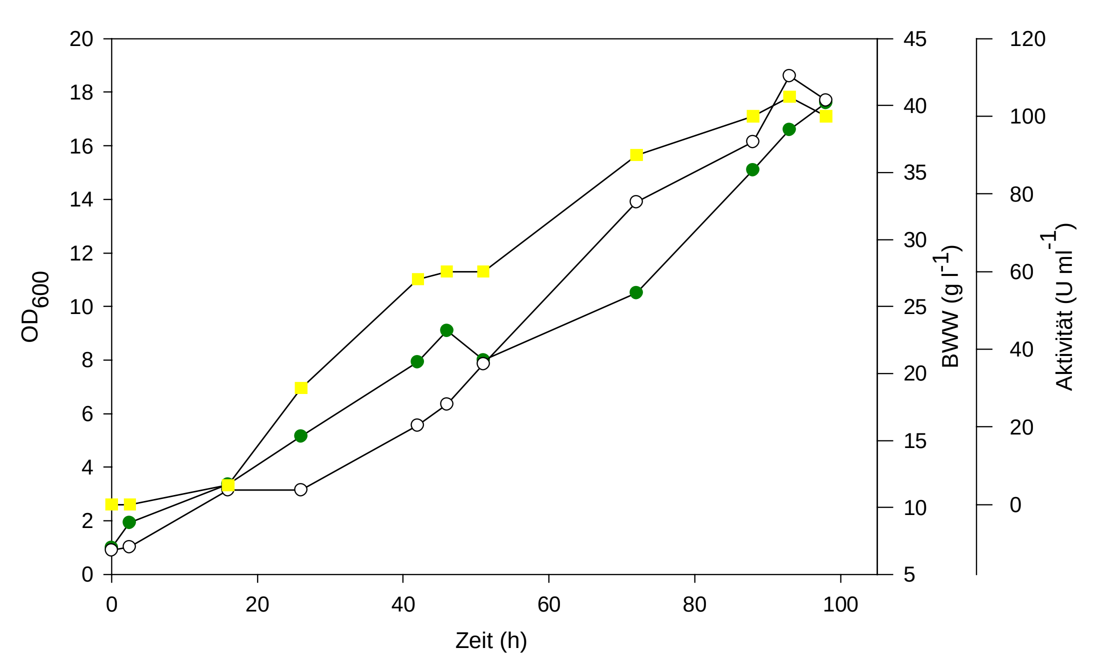

Abbildung 2.5: Fermentation 1 in komplexem Medium mit Methanolzugabe nach jeweils 24 h.

(❍) Biofeuchtmasse (BWW), (●) OD_{600}, (■) Lipaseaktivität.

Im Fall von Fermentation 2 wurde eine höhere Ausbeute an Lipase erreicht, obwohl die Zellmasse im Fermenter mit ca. 35 g l^{-1} Zellen geringer war, als die bei Fermentation 1 mit 40 g l^{-1}. Dies spricht für die gesteigerte Expressionsleistung der Hefe durch die verbesserte Fütterungsstrategie.

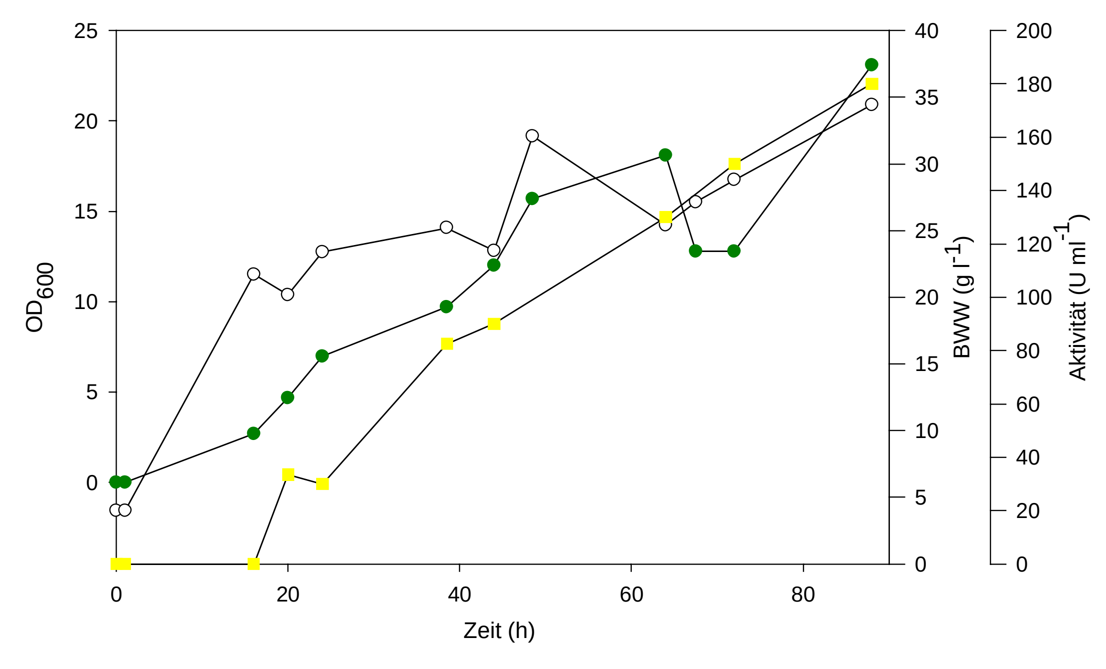

Abbildung 2.6: Fermentation 2 in komplexem Medium mit Methanolzugabe gekoppelt an CO_2-Gehalt im Abgas.

(❍) Biofeuchtmasse (BWW), (●)OD_{600}, (■) Lipaseaktivität.

2.2.2 Kultivierung in komplexem Medium mit Glycerin Fed-Batch

Die Analyse der Fermentationen 1 und 2 ergab, daß zur Erhöhung der Ausbeute an aktiver ROL sowohl die Fütterungsstrategie, als auch die erreichte Zellmasse entscheidende Parameter waren. Zur Erhöhung der Biomasse wurde deswegen zu Beginn von Fermentation 3 1% Glycerin (v/v) zum Fermentationsmedium zugegeben. Im Verlauf der ersten Stunden sinkt die Konzentration des in der Fermentationsbrühe gelösten Sauerstoffs (*Dissolved Oxygen*, DO) kontinuierlich ab.

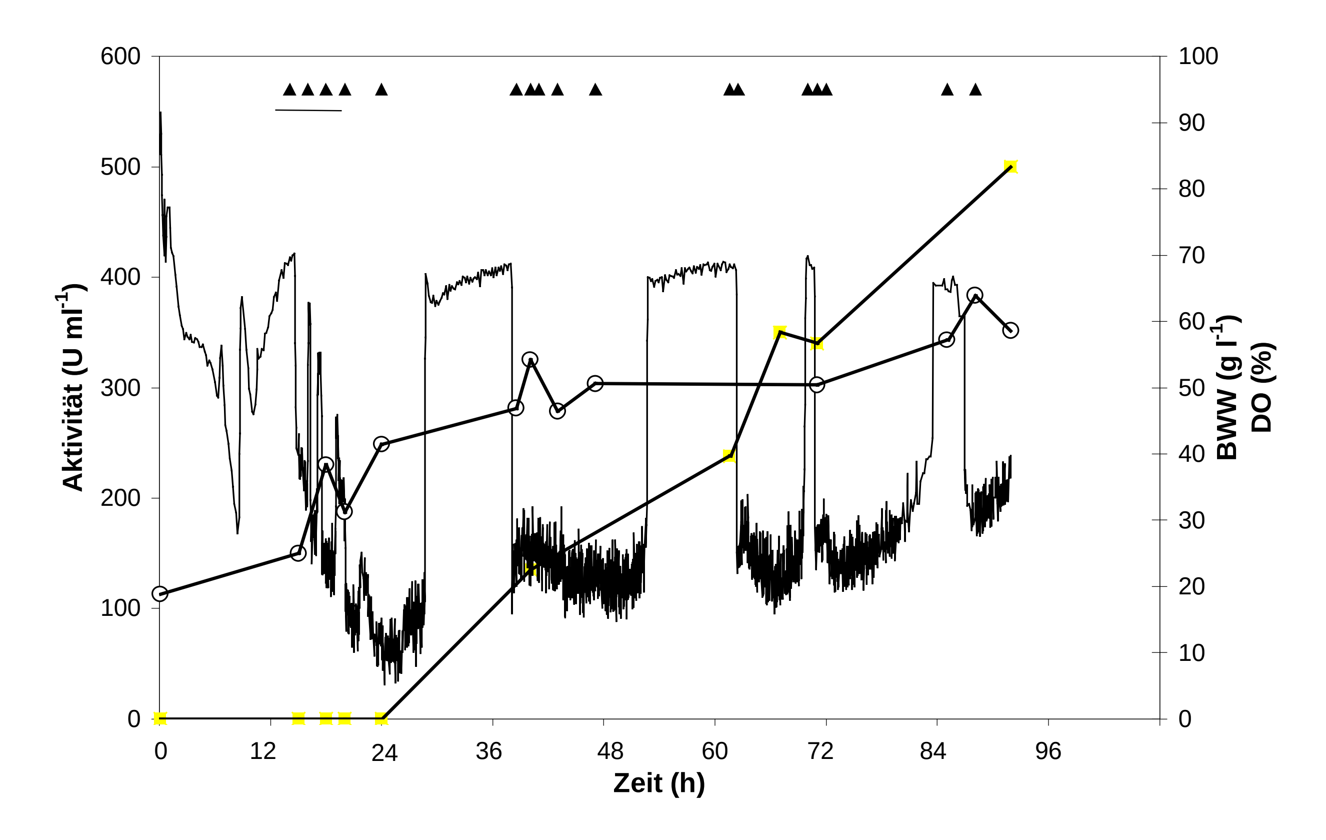

Abbildung 2.7: Fermentation 3 in komplexem Medium mit Methanolzugabe gekoppelt an DO-Gehalt im Fermenter-Überstand.

Die Glycerol-/Methanolzugabe wurde mit dem DO-Wert in der Kulturbrühe gekoppelt.

(▲) Fütterungspulse, die unterstrichenen Dreiecke stehen für 1 % (v/v) Glycerin, die nicht unterstrichenen für Methanol 0,5 % (v/v)

(❍) Biofeuchtmasse (BWW), (■) Lipaseaktivität.

Nach ca. 16 h zeigte der starke Anstieg des DO-Werts den vollständigen Konsum des Glycerins durch die Hefe an (Abbildung 2.7). Daraufhin wurde viermal mit jeweils 1 % (v/v) Glycerin nachtitriert. Wobei durch die größere Zellmasse das Glycerin wesentlich schneller wie zu Beginn verbraucht wurde (Fütterungspulse mit Glycerin werden durch die unterstrichen Dreiecke in Abbildung 2.7 repräsentiert).

Als Indikator, daß das Glycerin jeweils vollständig verbraucht war, wurde wieder der DO-Gehalt verwendet, stieg dieser innerhalb von zwei minuten um mindestens 10 %, wurde wieder Glycerin zugefüttert. Dies führte nahezu zu einer Verdoppelung der Biomasse. Nach einer Fermentationsdauer von 24 h wurde mit der Induktion durch Zugabe von Methanol begonnen. Während sich der CO_2-Wert im Abgas nur sehr langsam veränderte (nicht gezeigt) konnte durch verfolgen des DO-Wertes, ebenso wie beim Glycerin, sehr schnell der Mangel an Methanol detektiert werden. So wurden immer 0,5 % (v/v) Methanol zur Fermenterbrühe gegeben, sobald eine signifikante Erhöhung des DO-Gehalts zu beobachten war. Nach der Zugabe sank der DO-Wert in der Regel ebenso schnell wieder ab, wie er bei C-Quellen Limitierung gestiegen war.

Mit dieser einfachen Fütterungsstrategie konnte die Ausbeute während einer Fermentationsdauer von 92 h auf 500 U ml^{-1} aktiver Lipase gesteigert werden, dies entspricht einer Produktivität von 5435 U l^{-1} h^{-1}. Mit dieser Fermentation konnte gezeigt werden, daß sich eine Steigerung der Biomasse und eine verbesserte Fütterungsstrategie positiv auf die Ausbeute an aktiver Lipase auswirken.

2.2.3 Kultivierung in synthetischem Medium ohne Methanol-Analytik

Die Arbeiten in synthetischem Medium wurden in einem Braun Fermenter (Biostat E; 5 l) durchgeführt, an den eine computergesteuerte Mikrobürette zur Fütterung angeschlossen wurde. Mit dieser konnte jede Minute eine definierte Menge Glycerin bzw. Methanol zur Fermenterbrühe zutitriert werden.
Durch die Kultivierungsversuche in Schüttelkolben unter Verwendung von Medien mit Glycerin bzw. Methanol als einziger C-Quelle konnte in Kapitel 2.1.2.2 gezeigt werden, daß alle getesteten mit pPICZαA_ROL transformierten *Pichia* Klone dem Mut^S Phänotyp angehörten.

Daher wurde als Ausgangspunkt für die Fütterungsstrategie bei Fermentation 4 die von Invitrogen (Fermentation Guidelines for the methylothrophic yeast Pichia pastoris; Invitrogen, Ca) für Mut^{S}-Phänotypen empfohlen wird, angewendet. Nach dem Glycerinbatch, dessen Ende durch ein signifikantes Ansteigen des DO-Wertes detektiert werden konnte (siehe vorheriges Kapitel) wurde über 4 h Glycerin zutitriert (1,5 ml min^{-1}, 50 % (v/v) Glycerin mit 12 ml l^{-1} Spurenelement-Lösung (PTM1)). Nachdem der Fed-Batch gestoppt wurde, stieg der DO-Gehalt binnen weniger Minuten stark an, daraufhin wurde mit der Zufütterung von Methanol begonnen.

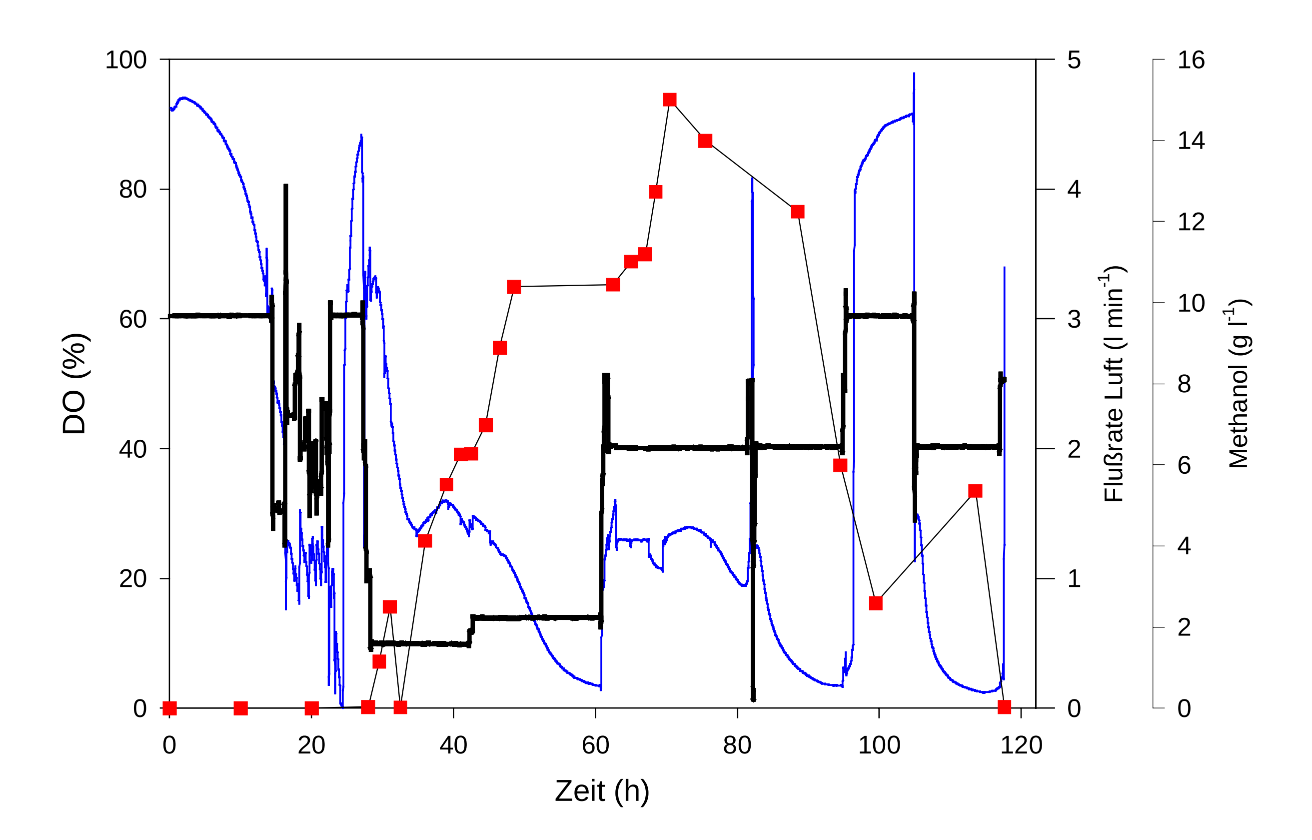

Abbildung 2.8: Vergleich der Flußrate der Luft (___), des DO-Gehalt (___) im Fermenter bei Fermentation 4 und dem tatsächlichen Methanolgehalt (■) bei kontinuierlicher Fütterung mit Methanol.

In den Fermentationen 2 und 3 wurde eine Methanol-Limitierung durch sinken der CO_2-Emission im Abgas bzw. des Gehalts an gelöstem Sauerstoff im Fermenter angezeigt. Es wurde deshalb angenommen, daß dies auch bei der Kultivierung in synthetischem Medium anwendbar sei. Parallel wurde, um eine zuverlässige Aussage über den Methanol-Gehalt treffen zu können eine GC-Methode zur Detektion des Methanols entwickelt (siehe Kapitel 2.2.4).

So stellte sich bei der späteren Analyse des Methanolgehaltes von Proben aus dieser Fermentation mittels GC (Abbildung 2.9) heraus, daß bei dem vorliegenden Mut^S Phänotypen (siehe Kapitel 2.1.2), weder die CO_2-Emission im Abgas (nicht gezeigt), noch der DO (Abbildung 2.8) in der Fermenterbrühe, Schlüsse auf den tatsächlichen Methanol-Gehalt bei kontinuierlicher Fütterung in synthetischem Medium geben konnten.

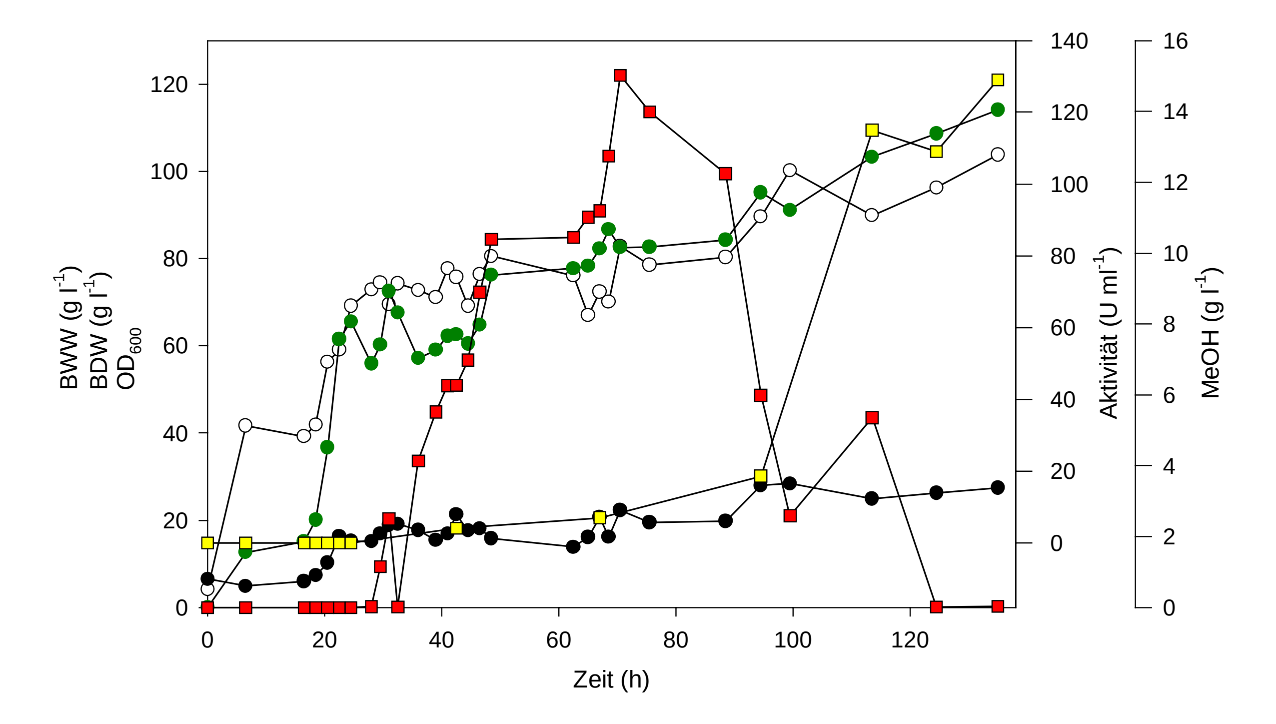

Abbildung 2.9: Fermentation 4 in synthetischem Medium mit der berechneten Fütterungsstrategie nach Invitrogen ohne Methanolkontrolle.
(❍) Biofeuchtmasse (BWW), (●) Biotrockenmasse (BDW), (●) OD_{600}, (■) Methanol-Gehalt, (■) Lipaseaktivität.

Die ersten beiden Stunden wurde mit einer Flußrate von 5 ml h^{-1} Methanol (enthält 12 ml PTM1 Salzlösung pro Liter Methanol) pro Liter Fermenterbrühe gefüttert. Danach wurde die Fütterungsrate alle 30 Minuten um 10 % erhöht, bis die maximale Fütterungsrate von 15 ml h^{-1} pro Liter Fermenterbrühe erreicht war. Wie in Abbildung 2.8 zu sehen, sinkt der DO-Wert zwischen 30 und 50 h ab, selbst eine Steigerung der Luftzufuhr konnte das Absinken nur ungenügend kompensieren. Dies wurde als Indiz gewertet, daß die eingeschlagene Fütterungsstrategie richtig war.

Wie jedoch die spätere Analyse der entnommenen Proben ergab, stieg dabei der Methanolgehalt bis auf den toxischen Level von 10 g Methanol l^{-1} an (Abbildung 2.9). Durch Erhöhung

des Lufteintrags konnte der zwischenzeitlich auf nahezu 0 % abgesunkene Wert für den gelösten Sauerstoff wieder auf über 20 % erhöht werden. Nach ca. 70 h begann der DO-Wert bei gleicher Flußrate der Luft erneut abzusinken und zeigte damit vermeintlich eine C-Quellen Limitierung an. Die Methanol-Analyse ergab jedoch eine Stagnation des Methanol-Gehaltes auf 10 g l^{-1}, bzw. sogar eine Steigerung auf fast 15 g l^{-1}.
Bei Fermentation 4 konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Hefezellen bei einer Konzentration über 1 % (v/v) Methanol nicht absterben, sondern nur keine Expression mehr zu beobachten ist. Vielmehr scheinen die Zellen in einer Art paralysiertem Zustand zu sein. Die Expression setzte zu dem Zeitpunkt wieder ein, an dem der Methanolgehalt, vermutlich hauptsächlich durch den Austrag durch Verdunstung, nach 90 h moderate Werte erreichte. Durch die starke Expression in den letzten 30 h konnte trotzdem eine Lipaseaktivität von 130 U ml^{-1} erreicht werden. Dies entspricht einer Produktivität von 4800 U l^{-1} h^{-1}.

2.2.4 Bestimmung des Methanol-Gehalts des Fermentationsüberstands

Zur Validierung der GC-Methode für die Gehaltsbestimmung von Methanol in Fermenterüberständen wurden Methanol-Basalsalz Medium Mischungen gaschromatographisch untersucht.
Abbildung 2.10 zeigt, daß zwischen dem GC-Signal und dem Methanolgehalt im Medium, ein linearer Zusammenhang besteht. Vergleichbare Untersuchungen mit BMMY-Medium ergaben, daß die Methode ebenso bei der Methanol-Analyse von Kultivierungen in komplexem Medium angewendet werden kann (nicht gezeigt). Bei der Untersuchung von Lösungen mit einem Methanolanteil von mehr als 5 g l^{-1} wurden diese entsprechend verdünnnt.
Durch die Zumischung von Ethanol und Glycerin konnte gezeigt werden, daß Methanol und Ethanol mit dieser Methode parallel analysiert werden können. Glycerin stört zwar die Analyse der beiden anderen Alkohole nicht, quantifizierbare Aussagen waren jedoch nicht möglich, da die Signalstärke nicht mit dem tatsächlichen Glyceringehalt korrellierbar war (nicht gezeigt).

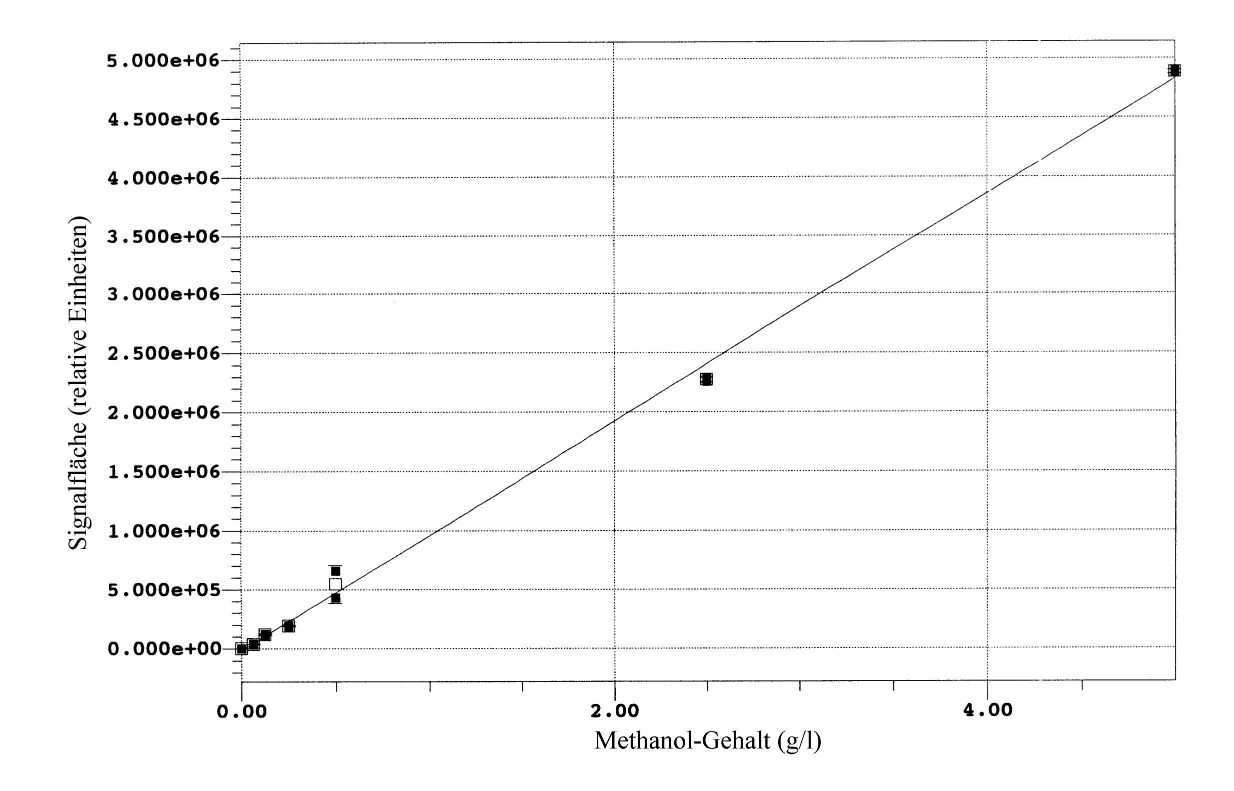

Abbildung 2.10: Kallibriergerade für die Bestimmung des Methanolgehalts in synthetischem Basalsalz Medium.

Die einfache Probenvorbereitung (Zentrifugation (14000 U min^{-1}; 1 min) und Filtration (0,4 µm), sowie die kurze Laufzeit im GC bis zur Detektion 4,5-5 Minuten bzw. inklusive der Ausheizphase von ca. 15 Minuten ermöglichten alle 20 Minuten eine Methanolanalyse parallel zur Fermentation.

2.2.5 Kultivierung in synthetischem Medium mit Methanol-Analytik

Aus den vorangegangenen Fermentationen wurde geschlossen, daß die Methanolkonzentration in der Fermenterbrühe ein Schlüsselparameter bei der ROL Produktion in *Pichia pastoris* ist. Dies gilt in komplexem Medium, verstärkt aber noch in synthetischem Medium. Folglich wurde in der nächsten Fermentation (Fermentation 5) durch Analyse des Methanolgehalts insbesondere darauf Wert gelegt, die Methanolkonzentration nie auf den toxischen Wert von 10 g l^{-1} ansteigen zu lassen. Der Beginn der Fermentation verlief mit Glycerinbatch- und anschließender Glycerinfütterung analog Fermentation 4 (siehe Kapitel 2.2.3). Als Konsequenz aus der vorangegangenen Fermentation wurde zu Beginn der Induktion die Methanol-Fütterungsrate stark gedrosselt. Es wurde mit der Zugabe von 1,8 ml h^{-1} Methanol begonnen und diese abhängig von der gemessenen Methanolkonzentration erhöht. So wurde wie aus Abbildung 2.12 hervorgeht, zu keinem Zeitpunkt im Verlauf der Fermentation ein Methanol-Wert über 3 g l^{-1} erreicht.

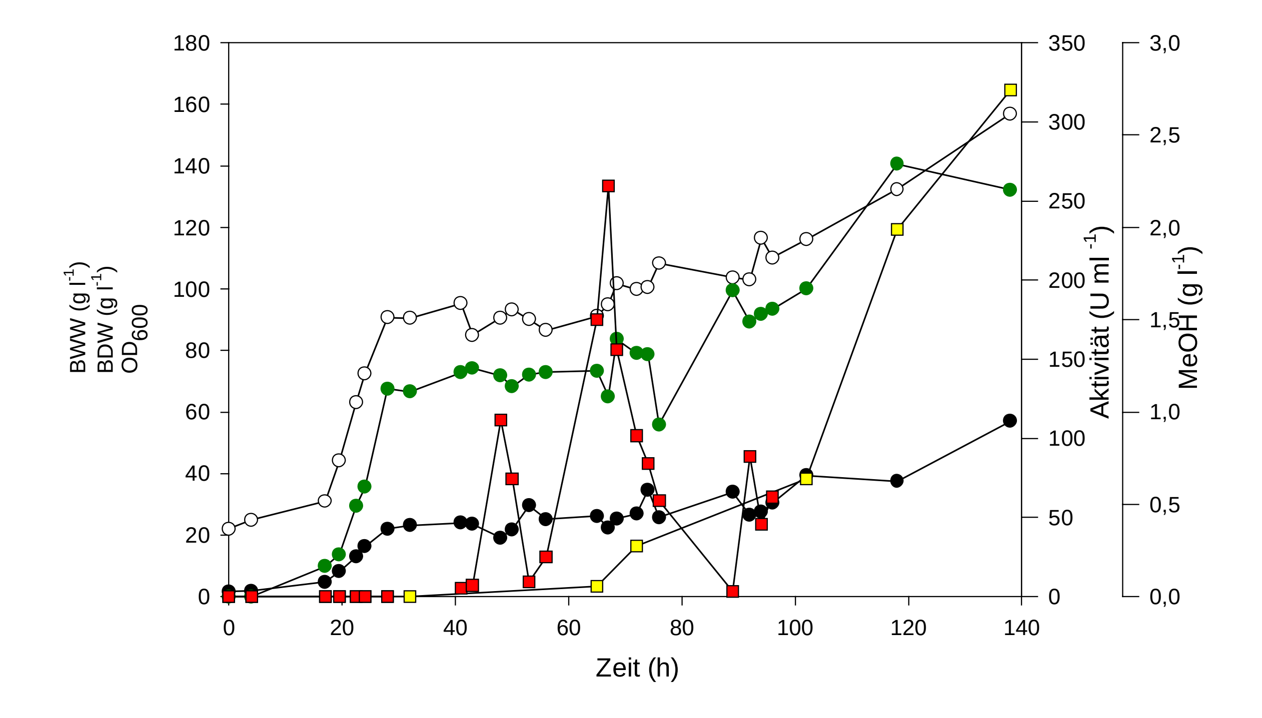

Abbildung 2.11: Fermentation 5 in synthetischem Medium mit Methanol Kontrolle durch GC.

(❍) Biofeuchtmasse (BWW), (●) Biotrockenmasse (BDW), (●) OD_{600}, (■) Methanol-Gehalt (g l^{-1}), (■) Lipaseaktivität.

Erst 40 h nach Beginn der Induktion konnte zum ersten Mal Lipaseaktivität im Medium nachgewiesen werden. Trotz der strikten Kontrolle des Methanolgehalts konnte also die Zeit, bis zur ersten Detektion von Lipaseaktivität im Fermenter nicht signifikant reduziert werden. Erklärungsmöglichkeiten für diesen Befund sind eine lange Adaptionszeit, beim Wechsel der C-Quelle von Glycerol zu Methanol, aber auch Verzögerungen bei der Sekretion in synthetischem Medium. Durch die optimierte Fütterung konnte nach 138 h Kultivierung eine Aktivität von 320 U ml^{-1} erreicht werden. Dies entspricht einer Produktivität von 11600 U l h^{-1}.

2.2.6 Kultivierung mit Glycerin-Methanol Mischfütterung

Obwohl der Methanolgehalt im Verlauf von Fermentation 5 (Abbildung 2.11) nie kritische Werte erreichte, konnte im Überstand erst nach ca. 70 h Fermentationsdauer Lipaseaktivität (ca. 40 h nach Beginn der Induktion) nachgewiesen werden.

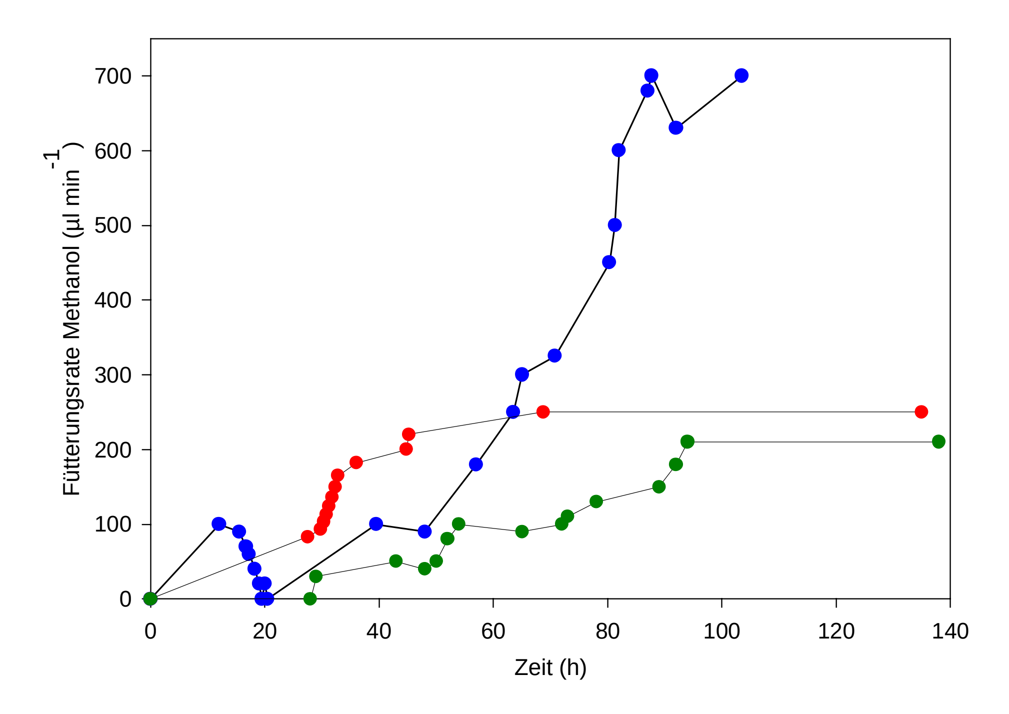

Abbildung 2.12: Vergleich der Fütterungsrate zwischen Fermentation 4, 5 und 6. In Fermentation 4 (●) wurde eine Fütterungsrate vorgegeben, während in Fermentation 5 (●) die Fütterungsrate vom tatsächlichen Methanolgehalt im Fermenter abhing. In Fermentation 6 (●) wurde im Glycerin Fedbatch schon Methanol zugegeben (12-20 h).

Um diese Zeit – und damit die Fermentationsdauer selbst – zu reduzieren, wurde eine Mischfütterungs-Strategie mit Methanol und Glycerin zu Beginn der Fermentation 6 entwickelt, um die Adaptionszeit nach Beenden der Fütterung mit Glycerin zu verkürzen. Dabei stieg der Methanolgehalt im Fermenter zu Beginn bis zu 0,5 % (w/v) an. Sobald das Glycerin verbraucht war, konnte eine höhere Fütterungsrate verwendet werden, genauso wie bei den Fermentationen 4 und 5 stieg dabei die Methanolkonzentration stark an (Abbildung 2.12), ohne jedoch die zulässigen Werte zu überschreiten (Abbildung 2.13).

Obwohl in Fermentation 6 schon nach 12 h mit der Zugabe von Methanol zusammmen mit Glycerin begonnen wurde, konnte Lipaseaktivität erst nach 70 h Fermentationsdauer (ca. 60 h nach Induktionsbeginn, 50 h nachdem kein Glycerin mehr im Medium detektiert wurde) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.13) .

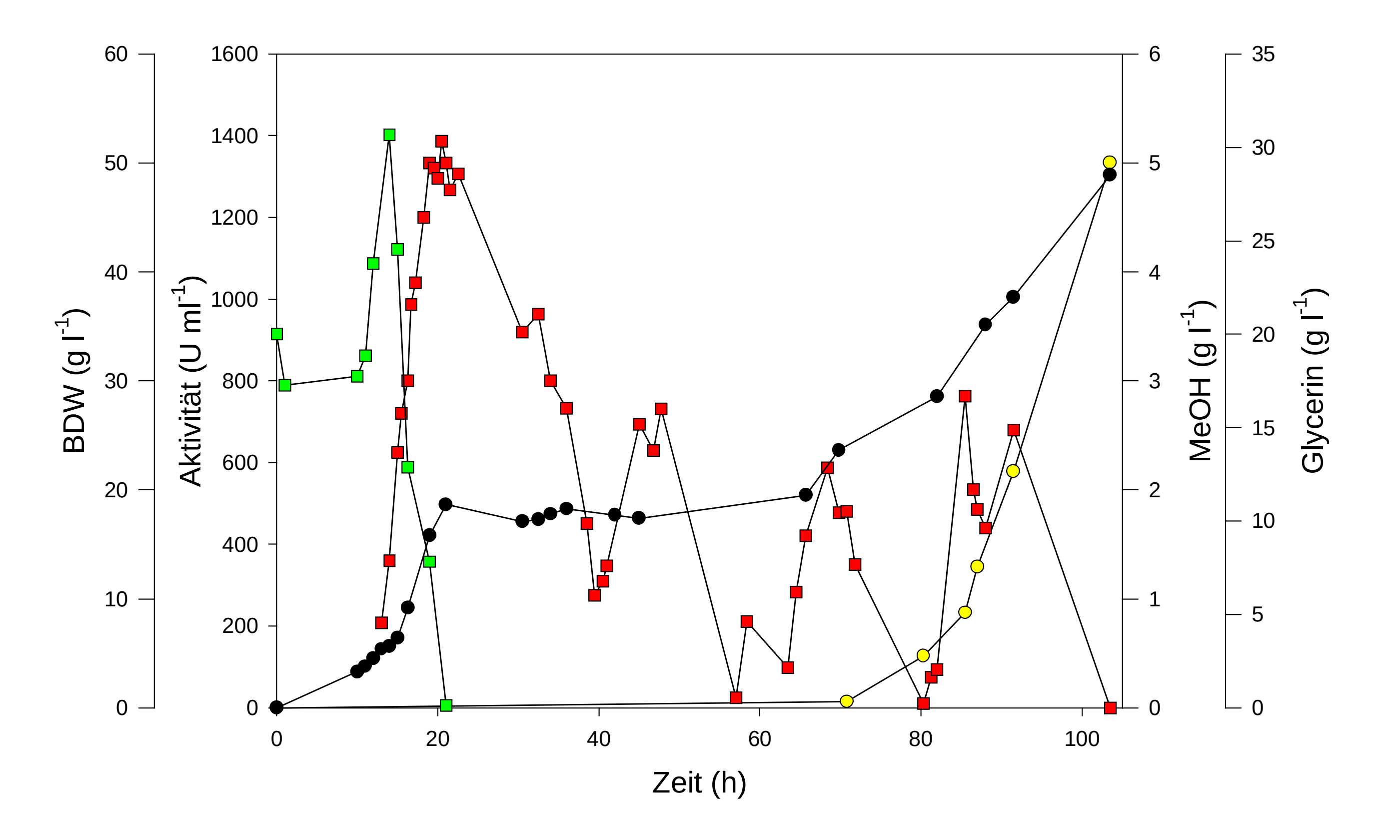

Abbildung 2.13: Fermentation 6 in synthetischem Medium mit Glycerin-Methanol Mischfütterung zu Beginn der Fermentation.

(●) Biotrockenmasse (BDW), (■) Methanol-Gehalt, (■) Lipaseaktivität, (■) Glycerin-Gehalt.

Dies ist vergleichbar zu Fermentation 5, jedoch war der Anstieg der Lipaseaktivität wesentlich steiler. So wurde die in Fermentation 5 nach ca. 140 h Kultivierungsdauer erreichte Aktivität von 320 U ml^{-1} in dieser Fermentation schon nach ca. 87 h erreicht. Außerdem wurde durch die frühzeitige Induktion eine wesentlich höhere Aktivität von 1330 U ml^{-1} im Fermenterüberstand erreicht. Da diese Kultivierung auch wesentlich kürzer war als die vorangegangenen, erhöhte sich die Produktivität auf 12826 U l^{-1} h^{-1} (Abbildung 2.13).

2.3 Aufreinigung und Charakterisierung der ROL aus *Pichia pastoris*

2.3.1 Reinigung der in komplexem Medium kultivierten ROL aus *Pichia pastoris* (Kultivierung in Schüttelkolben).

Die Sekretion der reifen Lipase in aktiver Form durch *P. pastoris* in das Medium machte eine Reihe von Aufarbeitungsschritten, die für die Expression in *E. coli* entwickelt wurden, überflüssig. Die Analyse der angefertigten SDS-Gele ergab jedoch, daß im Überstand noch kontaminierende Proteine enthalten waren. Daher wurde ein Zweischritt-Reinigungsprotokoll entwickelt, das sich an die Reinigung der renaturierten Lipase, produziert in *E. coli* anlehnt (siehe Abbildung 2.14):

Der aus Kulturen im Schüttelkolben (500 ml in einem 2000 ml Erlenmeyerkolben mit einer lipolytischen Aktivität von 110 U* ml^{-1} bzw. einer spezifischen Aktivität von 13,6 U mg^{-1}) stammende Kultivierungsüberstand wurde, um die *Pichia* Zellen abzutrennen zentrifugiert. Das verbleibende Medium wurde mit einer 10 kD Membran gegen Wasser diafiltriert. Dieser Schritt diente zwei Zielen: Erstens konnte damit der Kultivierungsüberstand auf ein Fünftel reduziert werden, was die Handhabung im zweiten Schritt vereinfacht, andererseits konnte damit schon ein Teil der verunreinigenden Peptide, sowie der im nächsten Aufarbeitungsschritt störenden Salze entfernt werden (siehe Tabelle 2.2). So konnte der erhaltene Überstand (100 ml mit einer lipolytischen Aktivität von 470 U ml^{-1} bzw. 23,1 U ml^{-1}) direkt chromatographiert werden.

Tabelle 2.2: Reinigungstabelle für ROL aus dem Kultivierungsüberstand aus 500 ml Schüttelkolbenkulturen von *Pichia pastoris* GS115 in komplexem Medium

Volumen der Lipaselösung (ml)	Reinigungsschritt	Gesamt-volumen-aktivität (U)	spez. Aktivität (U ml^{-1})	Reinigungs-faktor	Gesamt-Ausbeute (Ausbeute je Reinigungsschritt) (%)
500	-	55000	13,6	-	-
100	Diafiltration	47000	23,1	1,7	86 (86)
112	Ionenaustausch-chromatographie mit SP-Sepharose	16800	8571	363	31 (36)
28	Konzentration	16700	8571	1	31 (100)

* Alle angaben in U wurden im pH Stat mit Triolein als Substrat bestimmt (pH 8,1; 30 °C)

Die ROL verfügt über einen hohen isoelektrischen Punkt von ca. 9,3. Deshalb sollte die weitere Reinigung über Kationenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose als nächstem Schritt erfolgen.

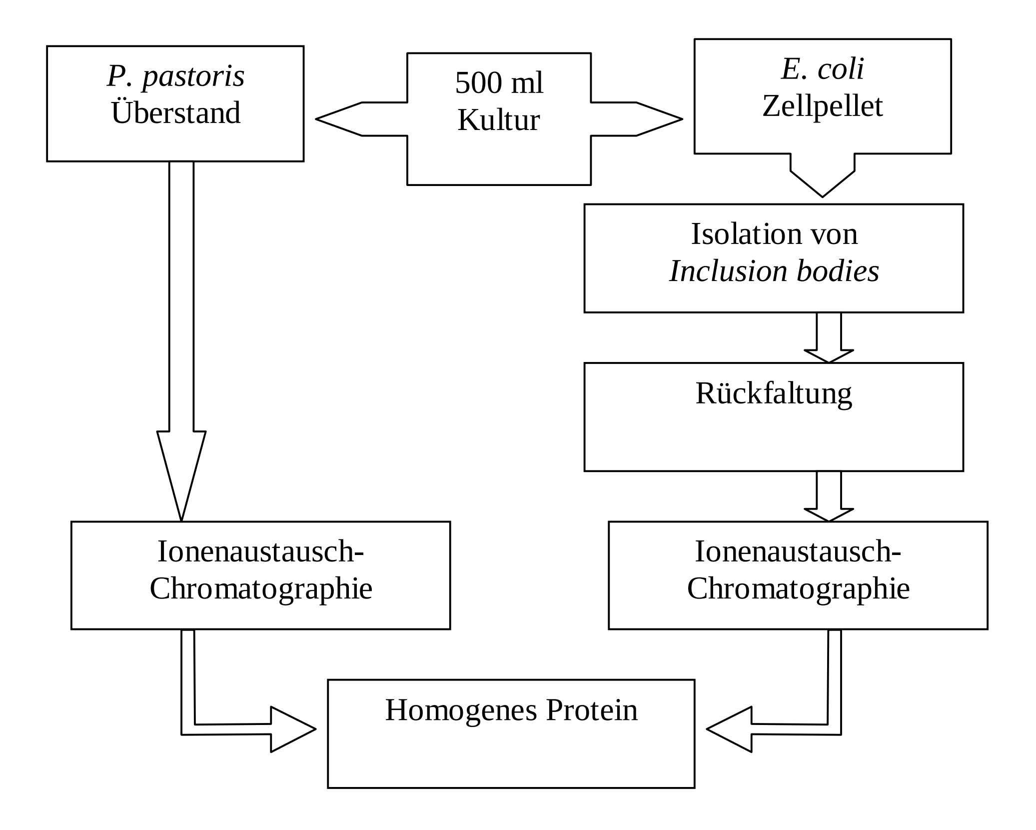

Abbildung 2.14: Vergleich der Arbeitsschritte bei der Kultivierung von ROL in *P. pastoris* und *E. coli*.
In dem Schema nicht berücksichtigt sind diverse Konzentrierung- und Dialyseschritte, die bei beiden Methoden notwendig sind.

Die FPLC-Säule (5 x 30 cm) wurde mit SP-Sepharose gepackt, die Säule mit 10 mM $CaCl_2$ äquilibriert und die Lipaselösung aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit dem Äquilibrierungspuffer wurde die Lipase mit einem NaCl Gradienten eluiert. Dabei stellte sich heraus, daß die ROL so stark an das Material bindet, daß sie erst bei der maximalen Konzentration von 1 M l^{-1} von der Säule eluiert wurde (Abbildung 2.15).

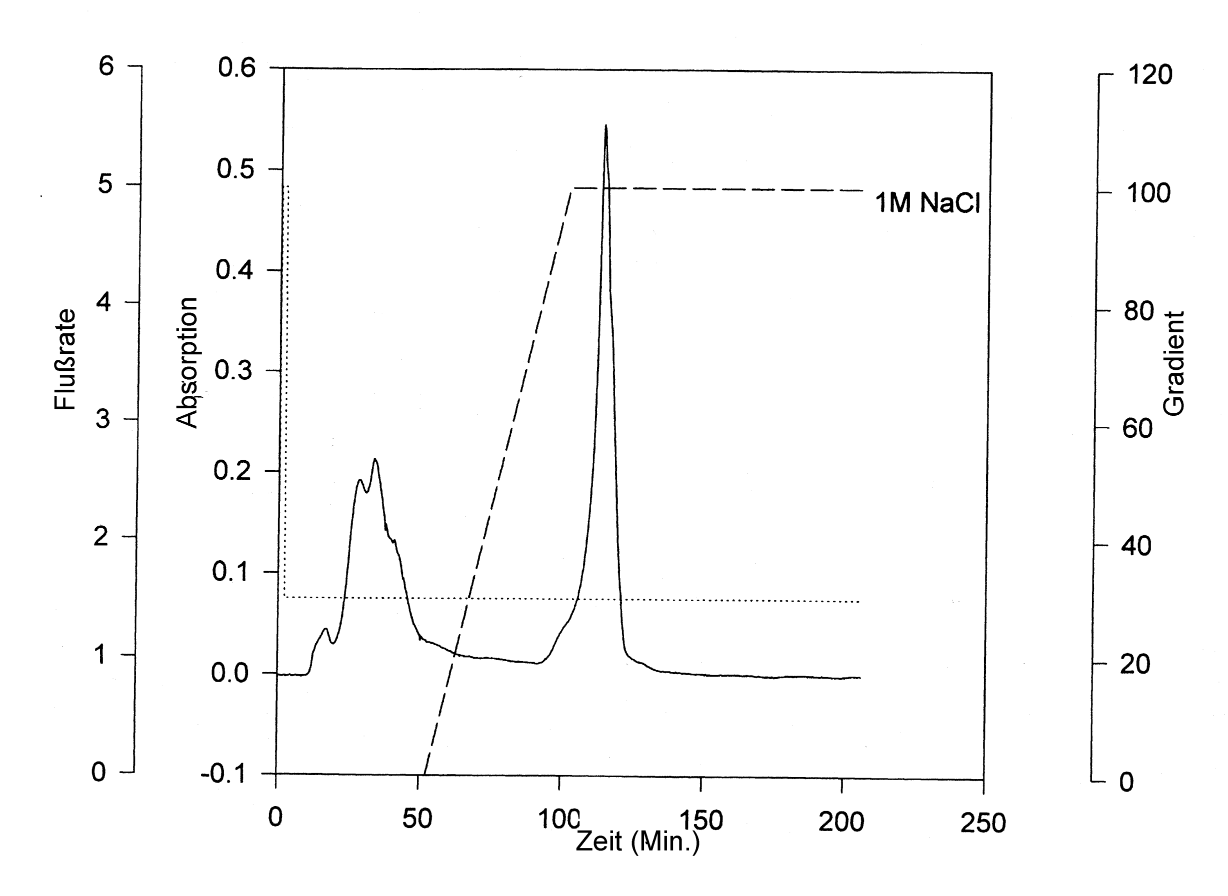

Abbildung 2.15: Elutionsprofil der Reinigung von ROL aus *Pichia pastoris* nach Kultivierung in komplexem Medium.

(......) Flußrate (ml Min^{-1}); (----) NaCl-Gradient zur Elution;

(___) Absorption (280 nm).

Die Fraktionen wurden mit dem pNPP-Schnelltest auf Lipaseaktivität überprüft. Jene Fraktionen, die eine Gelbfärbung aufwiesen, wurden vereinigt und die lipolytische Aktivität am pH-Stat bestimmt. Die vereinigten Fraktionen (28 ml mit 150 U ml^{-1}) zeigten eine spezifische Aktivität von 8571 U mg^{-1}, was einer 363-fachen Erhöhung entspricht und mit den Werten von 10000 U ml^{-1} für die ROL bzw. 5094 U ml^{-1} für die RDL aus *E. coli* gut übereinstimmt. Die homogene Lipase konnte dabei jedoch in wesentlich weniger Arbeitsschritten erhalten werden (Abbildung 2.14, Abbildung 2.16).

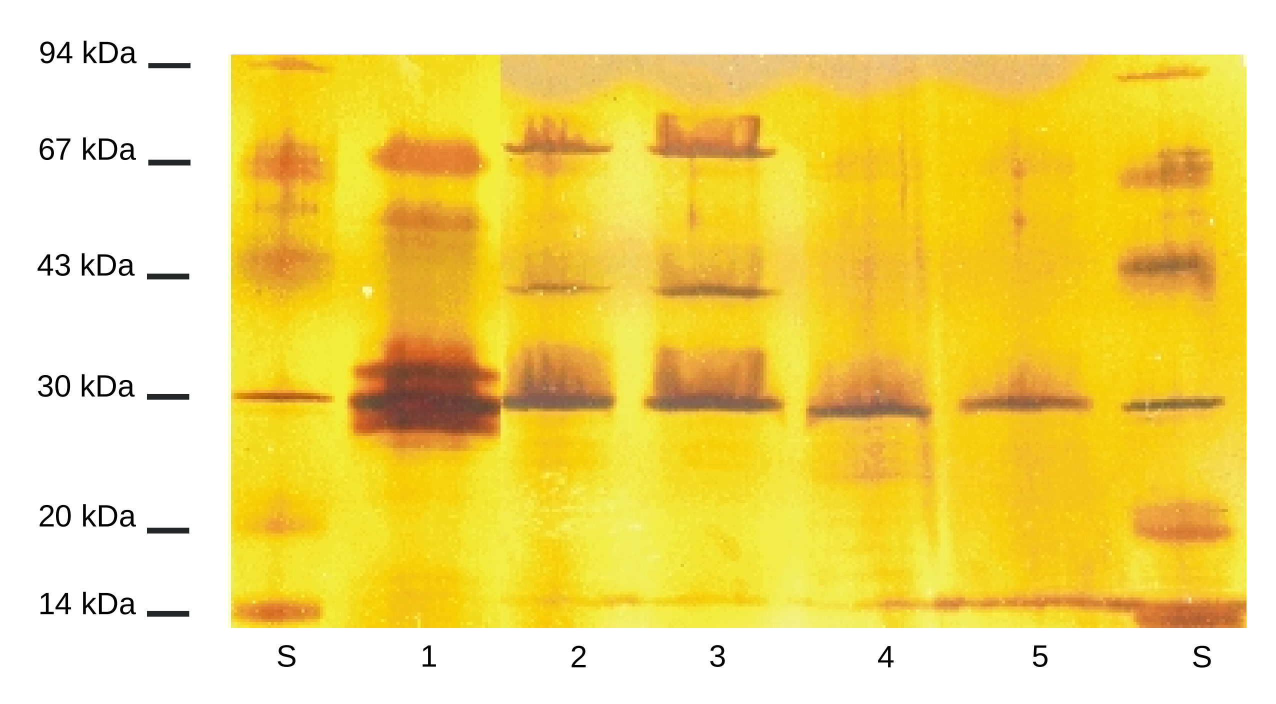

Abbildung 2.16: SDS PAGE der ROL aus *Pichia pastoris* kultiviert in komplexem Medium.

S LMW Standard; 1 Überstand (konz.); 2 gereinigte ROL, behandelt mit Endo H; 3 gereinigte ROL, behandelt mit Endo H unter denaturierenden Bedingungen; 4 gereinigte ROL aus *E. coli*; 5 gereinigte ROL aus *P. pastoris* (Die Abbildung wurde aus zwei separaten Gelen zur besseren Anschaulichkeit fusioniert).

Zur Lagerung wurde die homogene Protein-Lösung gegen Wasser dialysiert und lyophylisiert. Diese gefriergetrocknete Lipasepräparation wurde nach einer Lagerzeit von einem Jahr bei -20 °C unter Feuchtigkeitsausschluß erneut analysiert. Dabei konnte kein Verlust an Aktivität nachgewiesen werden.

2.3.2 Reinigung der in synthetischem Medium kultivierten ROL aus *Pichia pastoris*, (Fermentation 6)

Bei Reinigung der in synthetischem Medium kultivierten ROL aus *Pichia pastoris* wurde dieselbe Reinigungsstrategie, wie bei der in komplexem Medium verwendet (Kapitel 2.3.1). Der Überstand wurde diafiltriert, dies führte zu einem Verlust von ca. 20 % an Lipaseaktivität (vergleichbar zum analogen Schritt bei komplexem Medium in 2.3.1) gefolgt von einem 10 %igen Verlust bei der Dialyse gegen Wasser. Bei diesem Schritt ergab sich

überraschenderweise ein negativer Aufreinigungsfaktor, was bedeutete, daß in der Dialyse die Verunreinigung des Proteins zugenommen hätte. Da dies wenig wahrscheinlich ist, wurde dieses Ergebnis auf Probleme bei der Proteinbestimmung auf Grund der noch in der Lösung enthaltenen Salze (insbesondere der Übergangsmetallsalze) zurückgeführt, die schon die Bestimmung des Proteinsgehalts in der Kultivierungslösung direkt gestört hatten.

Im Folgenden wurde die Ionenaustausch-Chromatographie wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Die vereinigten Fraktionen korrespondierend zum Signal während der Elution (Peak 2) enthielten 60 % der zur Chromatographie eingesetzten Lipase, im Waschschritt (Peak 1) konnten weitere 29 % gefunden werden (analog Abbildung 2.15 für in komplexem Medium kultivierte ROL, Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Reinigungstabelle für ROL aus dem Kultivierungsüberstand aus 100 ml Fermenterkultur von *Pichia pastoris* in synthetischem Medium

Volumen Lipaselösung (ml)	Reinigungsschritt	Gesamtaktivität (U)	spez. Aktivität ($U\ mg^{-1}$)	Reinigungs-faktor	Gesamt-Ausbeute (Ausbeute je Reinigungsschritt) (%)
100	-	133400	n. b.*	-	-
50	Diafiltration	110000	490	-	82 (82)
156	Dialyse	97500	260	- 1,89*	73 (89)
280 (Peak 1)	Ionenaustausch-chromatographie mit SP-Sepharose	28000	520	0,5	11 (29)
186 (Peak 2)		58120	1950	7,5	22 (60)
93	Konzentration durch Diafiltration	58000	3290	1,68	22 (100)
155 (Elution mit H_2O)	HIC mit Phenylsepharose	0	-	-	-
alle Fraktionen (Elution mit NaCholat(1%))		0			
(Elution mit Triton X-100 (1%))		0			

* Durch die zu hohe Konzentration an Salzen und Übergangsmetallen in der Lösung war die Bestimmung der Proteinkonzentration nicht reproduzierbar möglich.

Nach der Reinigung durch Ultrafiltration und Ionenaustauschchromatographie zeigten sich neben der Lipasebande noch ein paar schwächere Banden (Abbildung 2.17). Dies steht im Einklang mit der gegenüber der Reinigung der ROL aus *Pichia pastoris* (kultiviert in komplexem Medium) verminderten spezifischen Aktivität von 3290 U mg^{-1}.
Deshalb wurde untersucht, ob durch Chromatographie auf Grund hydrophober Wechselwirkungen (*Hydrophobic Interaction Chromatography*, HIC) eine weitere Aufreinigung zu erreichen war.

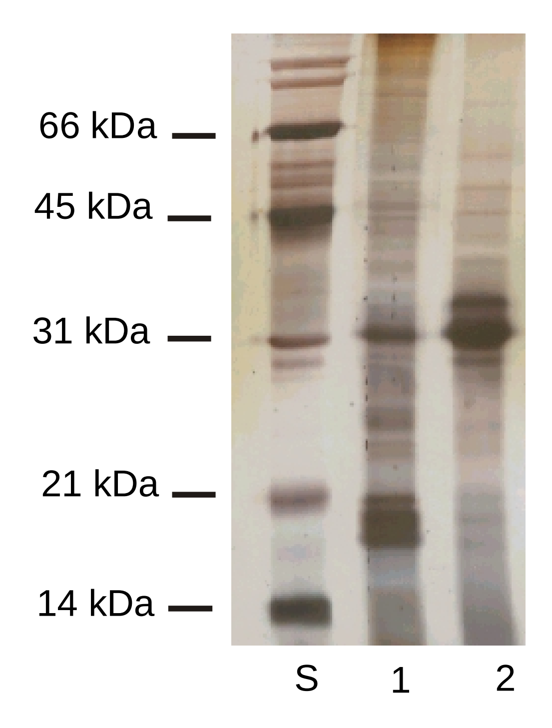

Abbildung 2.17: SDS PAGE der ROL aus *Pichia pastoris* kultiviert in synthetischem Medium.
S Standard; 1 ROL-Überstand 2 ROL gereinigt mit SP-Sepharose.

Da über die Eigenschaften der ROL für die HIC keine Daten aus der Literatur vorlagen, wurde zuerst Phenylsepharose verwendet, das bei der Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Octylsepharose (stärkere Wechselwirkung) und Butylsepharose (schwächere Wechselwirkung) liegt. Da bei der Kationenaustauschchromatographie 1 M NaCl als Elutionspuffer verwendet wurde, bot sich dieser Puffer als Auftragungs- und Äquilibrierungspuffer für die HIC an.
Bei der Reduktion der Salzkonzentration von 1 M NaCl auf reines Wasser durch einen linearen Gradienten zur Elution konnte mit dem pNPP-Test keine Lipaseaktivität in einer der gesammelten Fraktionen nachgewiesen werden, obwohl im Schreiberprotokoll des UV/VIS-Detektors ein Signal auftrat (ohne Abbildung). Daraufhin wurden verschiedene Detergentien

zur Elution eingesetzt. Der Einsatz von Natriumcholat (1% (w/v)) als Elutionsmittel resultierte in einigen Fraktionen, die im UV-Bereich Absorption zeigten, jedoch keine Lipaseaktivität (pNPP und pH Stat) zeigten. Die nachfolgende Elution mit Triton X-100 ließ sich durch die Eigenabsorption der in diesem Detergenz enthaltenen Phenylringe nicht mehr mit dem UV/VIS-Detektor verfolgen. Der Aktivitätsnachweis mit dem pNPP-Schnelltest war jedoch ebenfalls für alle Fraktionen negativ. Die Analyse des SDS Gels (nicht gezeigt) ergab, daß in einigen Fraktionen der Triton X-100-Elution ROL enthalten war, diese jedoch keine Aktivität mehr aufwies.
Es wurde dann ein schwächeres HIC-Material, Butylsepharose, verwendet. Auch hier ergab die Untersuchung aller Fraktionen keinerlei Aktivität.

2.3.3 Charakterisierung der ROL aus *Pichia pastoris* und Vergleich mit der ROL aus *E. coli*

2.3.3.1 Allgemeine Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Lipase wurden ausschließlich gereinigte Fraktionen aus Kultivierungen im Schüttelkolben verwendet. Die Eigenschaften der rekombinanten ROL aus *Pichia pastoris* wurde mit denen aus *Escherichia coli* verglichen.
Die ROL aus *E. coli* wurde nach der Methode von Beer *et al.* (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998) hergestellt. Nach Renaturierung und Aufreinigung konnten 5-7 mg ROL mit einer spezifischen Aktivität von 8300 U mg^{-1}, pH Stat, Triolein, 30 °C, pH 8,1 erhalten werden.
Die Analyse der SDS-PAGE (Abbildung 2.16) ergab sowohl für die ROL aus *Pichia pastoris* (Spur 5), wie für die aus *Escherichia coli* (Spur 4) eine einzelne Bande bei ca 30 kDa. Die ROL aus *E. coli* ist minimal leichter als die aus *Pichia pastoris,* da bei der Klonierung der ROL zwei Aminosäuren am N-Terminus hinzugekommen waren (siehe Kapitel 2.1.1).
Obwohl in der Aminosäuresequenz der ROL drei mögliche N-Glykosylierungsstellen mit der Aminosäuresequenz Asn-X-Ser/Thr (Kornfeld und Kornfeld 1985) vorliegen, konnte durch die Behandlung der Lipase mit endo-β-Acetylglycosamidase (Endo H), ein Enzym, daß N-verknüpfte Zuckerreste vom Protein abspaltet, kein Masseverlust detektiert werden (Abbildung 2.16, Spur 2). Dies ist ein Hinweis darauf, daß an der Außenseite des Proteins keine Zuckerreste vorkommen. Um zu ermitteln, ob die ROL an einer für Endo H unzugänglichen Stelle glykosyliert ist, wurde dasselbe Experiment mit dem denaturierten Enzym

durchgeführt . Auch hier zeigte sich keine Änderung der Masse (Abbildung 2.16, Spur 3). Die ermittelte Molmasse von ca. 30 kDa entspricht der bei der Expression in *E. coli*, einem Organismus, der als Prokaryot keine Glykosylierung an exprimierten Proteinen vornimmt. Dies führt zu dem Schluß, daß die ROL bei der Expression im Schüttelkolben nicht glykosyliert wird (Abbildung 2.16 Spuren 3+4).

Bei der Analyse der Banden der in synthetischem Medium kultivierten ROL zeigte sich, daß ein Teil der Lipase glykosyliert vorlag. So konnte die Bande bei ca. 32 kDa in Abbildung 2.17, Spur 2 der glykosylierten ROL zugeordnet werden, da sie nach Behandlung der Lipase mit Endo H verschwand (Serrano, persönliche Mitteilung). Zur Erklärung dieses Befundes gibt es zwei Möglichkeiten: Erstens, während der gesamten Kultivierungsdauer wird ein kleiner Teil der ROL glykosyliert, der Hauptteil jedoch nicht oder zweitens, während einer bestimmten Phase in der Fermentation wird die ROL glykosyliert, während sie in einer anderen (längeren) Phase nicht glykosyliert wird.

Zur Sekretion der Lipase wurde sie an den α-Faktor aus *Sacchromyces cerevisiae* fusioniert, der auch in *Pichia pastoris* funktionell ist. Dieser wird durch eine Protease (Kex2) während des Sekretionsvorgangs abgespalten.

Durch N-terminale Sequenzierung der ROL aus *Pichia pastoris* und *E. coli* konnte die korrekte Prozessierung des α-Faktors an der Kex2 Spaltstelle bestätigt werden. Dabei konnten auch die zwei zusätzlichen Aminosäuren, die durch Einführung der *Eco*RI-Schnittstelle an das 5´-Ende des ROL Gens entstanden,nachgewiesen werden. Von diesen zwei Aminosäuren abgesehen, stimmen die ersten acht Aminosäuren überein und decken sich mit den Angaben aus der Literatur (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998, Kugimiya, *et al.* 1992).

Tabelle 2.4: Durch Proteinsequenzierung ermittelte N-termiale Sequenz der ROL exprimiert in *E. coli* und *P. pastoris*

Lipase	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ROL (*E. coli*)	-	-	S	D	G	G	K	V	V	A		
ROL (*P. pastoris*)	E	F	S	D	G	G L*	K	V	V	A	A	T

* Bei der Bestimmung der Aminosäuresequenz konnte an dieser Position nicht zweifelsfrei zwischen G und L unterschieden werden. Die DNA-Sequenz legt jedoch nahe, daß es sich um ein G handelt.

Der isoelektrische Punkt wurde anhand der Aminosäuresequenz auf 8,3 berechnet (Bornscheuer, *et al.* 1999). Die isoelektrische Fokussierung ergab bei beiden Lipasen einen

sehr hohen Wert von über 9,3. Eine genauere Bestimmung des pI-Wertes durch isoelektrische Fokussierung war mit der vorhandenen Ausrüstung nicht möglich. Damit liegt der pI-Wert bei der rekombinanten ROL über dem für die native RDL bestimmten isoelektrischen Punkt von 8,6 (Haas, *et al.* 1992), der pI-Wert für die rekombinante RDL und die native ROL wurde nicht bestimmt (Haas, *et al.* 1991).

2.3.3.2 pH-Stabilität und pH-Optimum

Die Bestimmung der pH-Stabilität, bzw. des pH-Optimums wurde bei 30 °C im pH-Stat mit Triolein als Substrat durchgeführt.

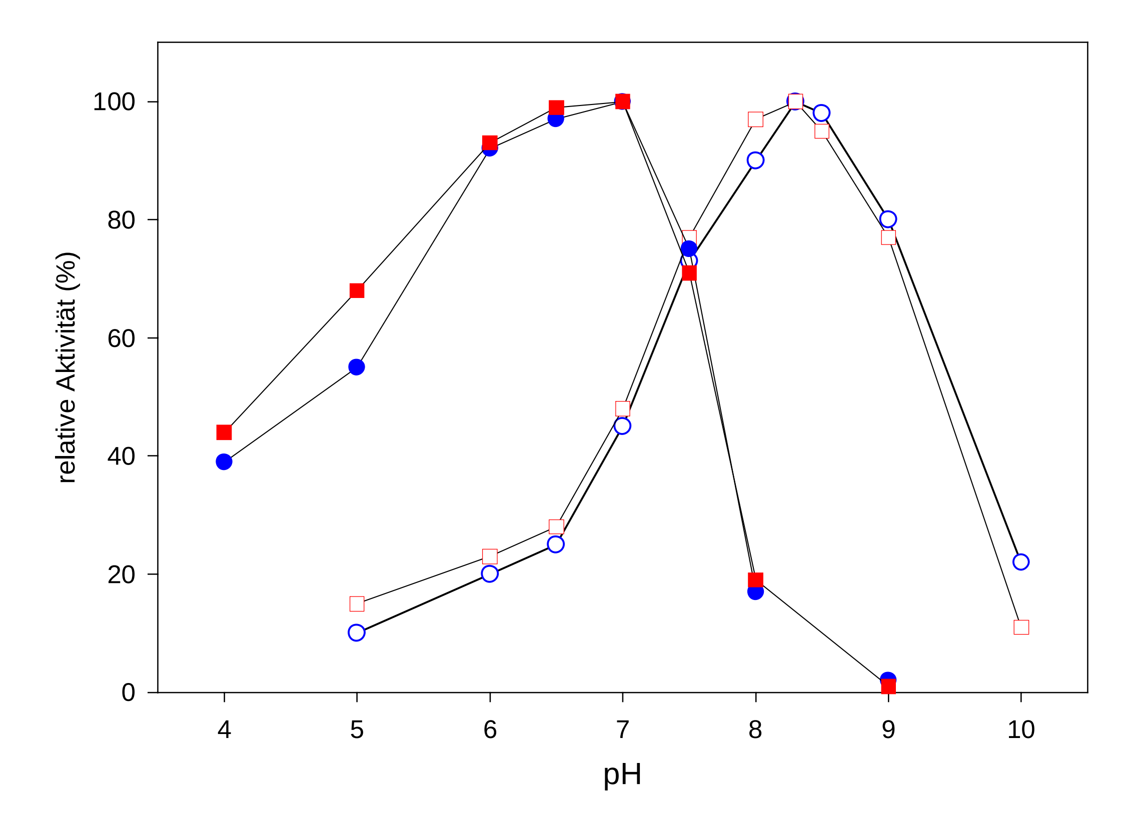

Abbildung 2.18: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der ROL aus *E. coli* und *P. pastoris*.

pH-Aktivität (offene Symbole) und pH-Stabilität (geschlossene Symbole) von ROL aus *Pichia pastoris* (●) und *E. coli* (■).

Das pH-Optimum lag bei der ROL aus *E. coli* bei 8,3, bei der aus *P. pastoris* bei 8,1 (Abbildung 2.18). Auch das Profil der beiden Lipasen unterschied sich kaum. Das gleiche

Ergebnis ergab die Untersuchung der pH-Stabilität. Hier lag das Maximum um pH 7. Der Vergleich der Aktivitätsprofile zeigt einen unsymmetrischen Verlauf, so zeigen sich beide rekombinanten ROL Präperationen gegenüber niedrigen pH-Werten toleranter als gegenüber hohen.

2.3.3.3 Temperatur-Stabilität und Temperatur-Optimum

Die Bestimmung der Temperatur-Stabilität, bzw. des Temperatur-Optimums wurde bei pH 8,1 im pH-Stat mit Triolein als Substrat durchgeführt.

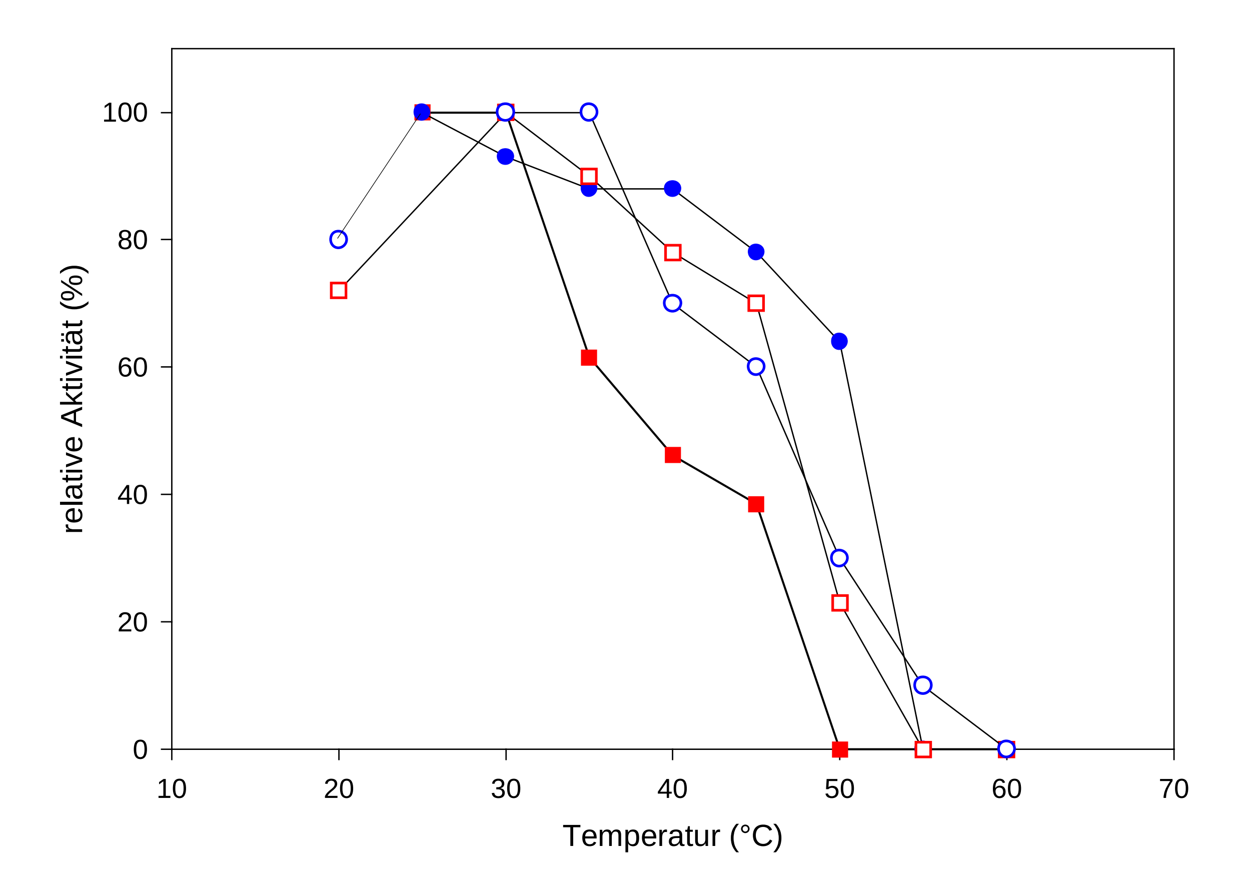

Abbildung 2.19 Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der ROL aus *E. coli* und *P. pastoris*.

Temperatur-Aktivität (offene Symbole) und Temperatur-Stabilität (geschlossene Symbole) von ROL aus *Pichia pastoris* (●) und *E. coli* (■).

Die Temperaturaktivität der ROL aus beiden Expressionssystemen ist nahezu identisch, das Optimum liegt bei 20-40 °C danach nimmt die Aktivität sehr schnell ab. Bei 50-60 °C ist kaum noch eine katalytische Wirkung der Lipase detektierbar (Abbildung 2.19).

Anders verhält es sich bei der Thermostabilität. Hier zeigt sich, daß die ROL aus *Pichia pastoris* deutlich stabiler ist, als die aus *E. coli*. Während die ROL aus *E. coli* schon bei 35 °C deutliche Einbußen der Aktivität auf knapp über 60 % zeigt, ist bei der ROL aus *Pichia pastoris* noch über 80 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Dieser Unterschied bleibt bei allen höheren Temperaturen bestehen. Während die ROL aus *E. coli* bei 50 °C keine katalytische Aktivität mehr zeigt, liegt die der ROL aus *P. pastoris* noch bei ca. 50 %. Höhere Temperaturen haben bei beiden Präparationen die vollständige Inaktivierung zur Folge.

2.3.3.4 Substratspektrum

Die Lipasen aus *Rhizopus oryzae* und *Rhizopus delemar* wurden in der Vergangenheit schon teilweise charakterisiert, eine vollständige Untersuchung der Kettenlängenspezifität wurde bisher jedoch nicht durchgeführt (Beer 1994, Beer, *et al.* 1996, Haas, *et al.* 1991, Haas, *et al.* 1992).

Tabelle 2.5: Kettenlängenspezifität der ROL aus *P. pastoris* und *E. coli*

Substrat	Relative Aktivität(%)[a]	Relative Aktivität (%)[a]
	E. coli	*P. pastoris*
Triacetin (2:0)	5 ± 1	3 ± 1
Tributyrin (4:0)	48 ± 3	30 ± 5
Tricaproin (6:0)	50 ± 5	42 ± 5
Tricaprylin (8:0)	114 ± 5	121 ± 4
Tricaprin (10:0)	104 ± 6	109 ± 4
Trilaurin (12:0)	16 ± 2	21 ± 2
Trimyristin (14:0)	9 ± 1	6 ± 2
Tripalmitin (16:0)	9 ± 1	6 ± 2
Tristearin (18:0)	7 ± 1	3 ± 1
Triolein (18:1)	100 ± 1	100 ± 1

a) Die Aktivität wurde auf die Aktivität gegenüber Triolein bezogen und diese wurde als 100 % definiert.

Die Kettenlängenspezifität wurde mit Emulsionen der entsprechenden Triglyceride in Phosphatpuffer ermittelt (pH Stat, 20 mM Triacylglycerin, 30 °C, pH 8,1). Es zeigte sich eine

deutliche Präferenz der rekombinanten Lipase zu Triglyceriden mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge.

2.3.4 Mutagenese der ROL zur Modifikation der Stereopräferenz gegenüber Triacylglycerin Analoga

Wie in Kapitel 1.1.5.2 beschrieben wurde von Scheib *et al.* L258 als entscheidende Aminosäure bei der Stereoselektivität der ROL gegenüber Triglycerin Analoga identifiziert und diese gegen F, A und S ausgetauscht und untersucht. Bei weiterführenden *Molekular Modelling* Untersuchungen wurden von Scheib *et al.* zwei weitere ROL-Mutanten vorgeschlagen, die einen noch stärkeren Effekt auf die Stereopräferenz der ROL gegenüber den Triacylglycerin Analoga zeigen sollten; L258Y und L258W (H. Scheib, persönliche Mitteilung). Außerdem konnten Hinweise darauf gefunden werden, daß diese Mutanten Verbesserungen bei der Racematspaltung von primären und sekundären Alkoholen erbringen könnten.
Ausgehend vom Plasmid pPICZαAROL wurden die zwei Mutanten durch die Quikchange Methode erzeugt. Je fünf positive Klone wurden selektiert und die aus ihnen isolierten Plasmide auf die Anwesenheit der gewünschten bzw. Abwesenheit von unerwünschten Mutationen untersucht. Es konnten für beide Mutanten je ein Plasmid gefunden werden, das diese Voraussetzungen erfüllte (pPICZαAROL_L258W und pPICZαAROL_L258W). Das weitere Vorgehen verlief analog zum Wildtyp (siehe Kapitel 2.1.3). Die Plasmide wurden erfolgreich in *Pichia pastoris* X-33 transformiert. Die Kultivierung von je zwei selektierten Klonen in Schüttelkolben ergab eine Aktivität von 50 U ml^{-1} für (L258W) und 45 U ml^{-1} für (L258Y). Die erzeugten Mutanten stehen nun zur Untersuchung ihrer Stereopräferenz gegenüber Triacylglycerin Analoga zur Verfügung. Die entsprechenden Untersuchungen werden im Rahmen einer Kooperation von einer Gruppe der Universität Lund, Schweden durchgeführt und stehen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.

2.4 Entwicklung eines Peptid-tags aus der Nickelbindungsstelle der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori* (HeliTag)

2.4.1 Variation und Klonierung der Nickelbindungsstelle aus der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori* an EGFP

2.4.1.1 Herstellung der Peptid-Bibliothek

Eine ideale Bibliothek von Peptiden setzt voraus, daß jede mögliche Abfolge von Aminosäuren mindestens einmal vorkommt und keine starke Bevorzugung bestimmter Sequenzen auftritt. Bei einem Tag mit einer Länge von zehn Aminosäuren ergeben sich also 20^{10} verschiedene Peptide. Man kann jedoch durch Konservierung einzelner wichtiger Stellen den Aufwand für das Screening deutlich reduzieren.

Anstatt völlig zufällige Peptidsequenzen zu verwenden, wurde die Metallbindungsstelle (WtHeliTag) einer ATPase aus dem human-pathogenen Stamm *Helicobacter pylori* (siehe Kapitel 1.3.2.5) als Matrix verwendet. Diese wurde von Volz *et al.* (Volz, *et al.* 1998) durch massenspektrometrische Untersuchungen sowie dem Sequenz-Vergleich verschiedener Metallbindungsstellen identifiziert. Durch die Verwendung dieser Konsensussequenz konnten die variablen Aminosäuren auf sechs reduziert werden.

Die einfachste und schnellste Möglichkeit, um einen solchen Tag an ein Reporterprotein zu fusionieren, ist eine PCR, in der degenerierte *Wobble*-Primer verwendet werden. Bei der Synthese der *Wobble*-Primer wird an den gewünschten Stellen ein Gemisch der dNTP´s verwendet.

2.4.1.2 Verwendung des *Green Fluorescent Proteins* (EGFP) zur Validierung des HeliTags

Um eine quantitative Auswertung der Eignung der HeliTags zur Proteinreinigung zu ermöglichen, wurde ein möglichst einfach zu detektierender Reporter gesucht. Dieser sollte eine Reihe von Eigenschaften besitzen:

1. In *E. coli* aktiv exprimierbar.
2. Möglichst geringe Molmasse.
3. In einem möglichst weiten pH Bereich stabil.
4. Stabil in Imidazol-Lösungen mindestens bis zu einer Konzentration von 0,5 M.
5. Einfach, möglichst visuell, detektierbar.
6. Quantifizierbar.
7. Geeignet für Hochdurchsatzverfahren.

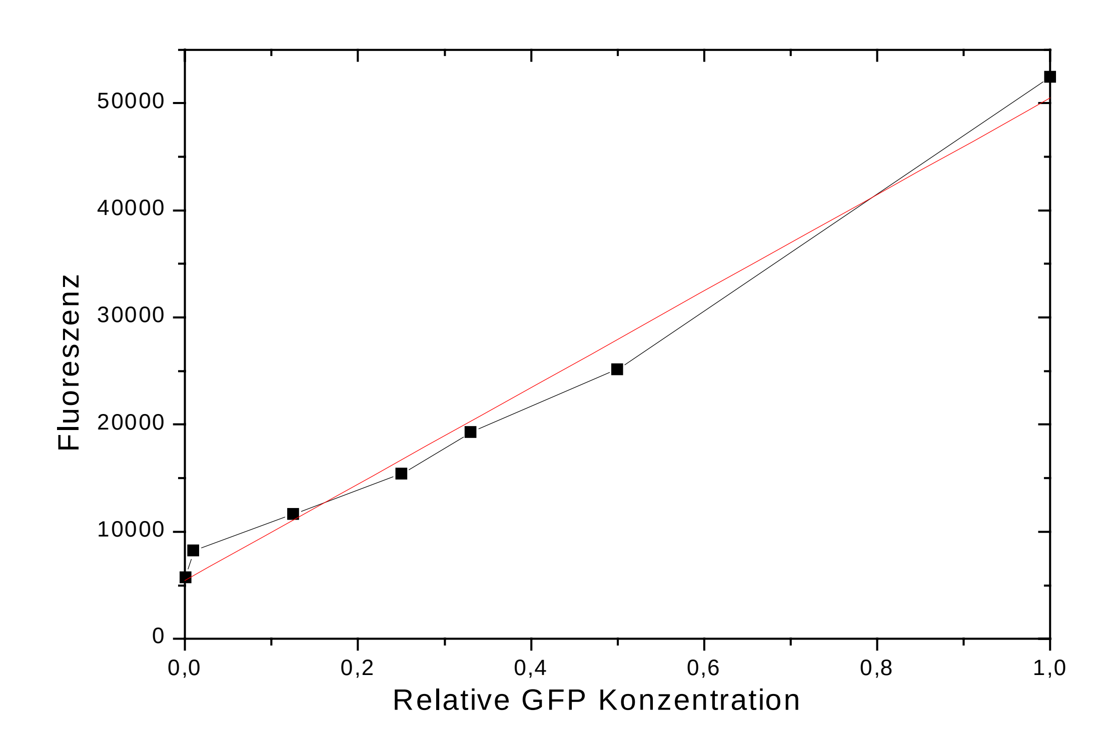

Abbildung 2.20: Korrelation zwischen EGFP Konzentration und gemessener Fluoreszenz.

Da EGFP alle diese Voraussetzungen erfüllt wurde es als Reporterprotein verwendet, um eine schnelle visuelle Detektion der Bindungseigenschaften ohne einen zusätzlichen Aktivitätstest zu ermöglichen (Poppenborg, *et al.* 1997). Durch die Messung der Fluoreszenz konnte ein

einfaches physikalisches Verfahren zur Quantifizierung verwendet werden, die Fluoreszenzspektroskopie. Die Fluoreszenz stimmt über einen weiten Konzentrationsbereich linear mit der Konzentration des EGFP überein (Abbildung 2.20).
Die lineare Regression der Messpunkte ergab jedoch keine Ursprungsgerade, dies kann durch das Auftreten von Streulicht bzw. fluoreszierende Komponenten aus dem Zellaufschluß bei der Messung in Mikrotiterplatten erklärt werden. Fluoreszenz-Werte unter 10000 sind nicht mehr direkt mit der EGFP Konzentration korrelierbar. Ein weiterer Vorteil des EGFP ist, daß sich der Betrag der Fluoreszenz auch über einen weiten pH Bereich zwischen 5,5-10 nicht änderte. Damit ist auch die Elution über einen pH Gradienten mit direkter Analyse der Fraktionen möglich.

2.4.1.3 Fusion der Random-HeliTag Sequenzen an EGFP

Es wurden die zwei Primer GFP_WHO_1 und GFP_WHO_2, die teilweise mit der Sequenz des EGFP kodierenden Gens übereinstimmten, für die PCR verwendet. Dabei enthielt der 5´-terminale Primer GFP_WHO_1 die HeliTag-Sequenz mit den für die sechs variablen und vier konservierten Aminosäuren (RandomHeliTag) kodierenden Nukleotiden und zusätzlich eine *Nco*I-Schnittstelle, mit GFP_WHO_2 wurde eine *Not*I-Schnittstelle ans 3´-Ende des EGFP Gens eingefügt. Als Templat für die DNA diente das Plasmid pEGFP (Clontech). Das PCR-Produkt und der Vektor wurden mit *Nco*I und *Not*I geschnitten und nach der Isolation der entsprechenden DNA-Fragmente durch Gelextraktion ligiert und bildeten die Plasmide pEGFP HeliTag. Abbildung 2.21 zeigt als Beispiel die mit dem degenerierten Primer GFP_Wobble_1 zur Einführung der HeliTags mit zufälliger Sequenz und GFP_Wobble_2 zur Einführung der *Not*I Schnittstelle am Ende. Der HisTag und der WtHeliTag wurden durch eine PCR mit den entsprechenden Primern an das EGFP fusioniert und ansonsten analog weiterverarbeitet.
Die ligierte DNA wurde in *E. coli* transformiert und Kolonien, die im UV-Licht grüne Fluoreszenz zeigten, wurden selektiert und in Mikrotiterplatten kultiviert.

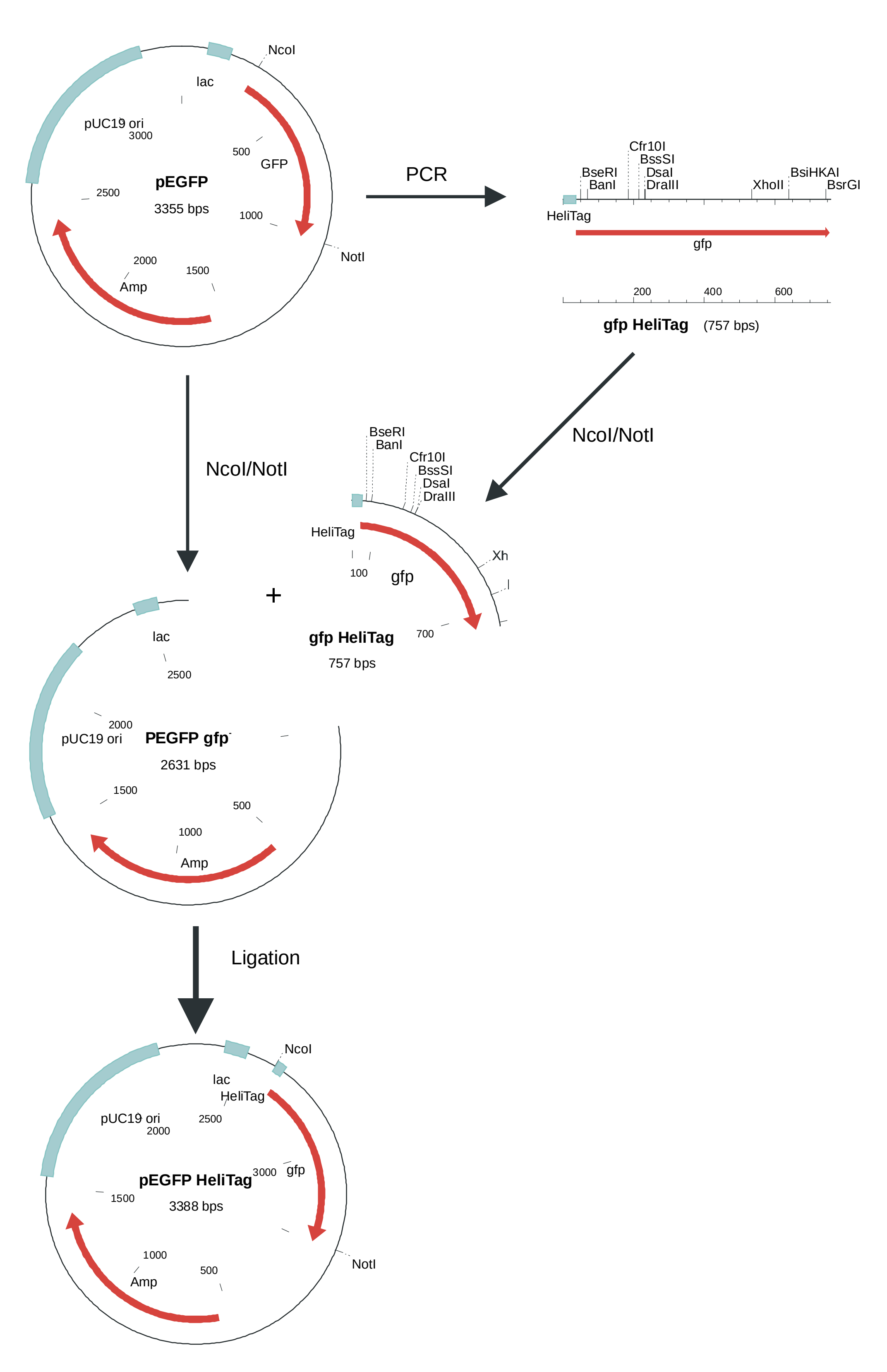

Abbildung 2.21: Klonierungsstrategie für die Fusion der PeptidTags an das 5´-terminale Ende des EGFP.

2.4.1.4 Sequenzierung der erzeugten HeliTags zur Validierung ihrer Diversität

Alle sequenzierten RandomHeliTags wiesen unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf, einige Beispiele hierfür zeigt Tabelle 2.6. Auch einige Kolonien, die keine Fluoreszenz zeigten, wurden sequenziert. Diese enthielten alle mindestens ein Stopcodon (z. B. A8, Z4, Z11, Z13). Da die HeliTags jedoch an das 5´-terminale Ende des EGFP-Gens integriert wurden, konnte es also in diesen Fällen gar nicht zur Expression des EGFP kommen.

Tabelle 2.6 : Aminosäuresequenz einiger RandomHeliTags

Name	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	AS7	AS8	AS9	As10	
A 1	His	Gly	His	Met	Glu	Arg	Cys	Leu	Val	Cys	EGFP
A 2	His	Lys	His	Ala	Arg	Ser	Cys	Met	Gly	Cys	EGFP
A 3	His	Phe	His	Thr	Val	Phe	Cys	Phe	Ser	Cys	EGFP
A 4	His	Arg	His	Arg	Gly	Met	Cys	Thr	Ala	Cys	EGFP
A 6	His	Gln	His	Glu	Gly	Arg	Cys	Lys	Glu	Cys	EGFP
A 8	His	Cys	His	Pro	Glu	Leu	Cys	Stop	Leu	Cys	EGFP
M 13	His	Asn	His	Arg	Tyr	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	EGFP
M 14	His	Ser	His	Ser	Val	Gly	Cys	Phe	Phe	Cys	EGFP
M 15	His	Gly	His	Thr	Leu	Ser	Cys	Gly	Leu	Cys	EGFP
M 16	His	Ser	His	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Gly	Cys	EGFP
Z 4	His	stop	His	Asn	stop	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	EGFP
Z 5	His	Arg	His	Gly	Thr	Asn	Cys	Leu	Lys	Cys	EGFP
Z 7	His	Ile	His	Gln	Ser	Asn	Cys	Gln	Val	Cys	EGFP
Z 8	His	Lys	His	Val	Asp	His	Cys	Gly	Arg	Cys	EGFP
Z 9	His	Ser	His	Leu	Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	Cys	EGFP
Z 10	His	Thr	His	Gln	Ser	Gln	Cys	Gly	Arg	Cys	EGFP
Z 11	His	Thr	His	Ala	Ser	Gly	Cys	stop	stop	Cys	EGFP
Z 13	His	Cys	His	Thr	Trp	Cys	Cys	Asn	stop	Cys	EGFP
Z 14	His	Arg	His	Leu	Phe	Trp	Cys	Ser	Glu	Cys	EGFP

2.4.1.5 Fusion der Nickelbindungsstelle der ATPase 439 (WtHeliTag) aus *Helicobacter pylori* an EGFP

Um die Eigenschaften der gefundenen HeliTags mit dem WtHeliTag vergleichen zu können, wurde das EGFP mit den Primern GFP_WT_1 und GFP_WHO_2 amplifiziert. Dabei wurde an das 5´-terminale Ende des EGFP Gens die orginal Nickelbindungsstelle aus der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori* fusioniert. Zusätzlich wurden wieder die Schnittstellen *Nco*I am 5´-terminalen Ende und *Not*I am 3´-Ende des EGFP-Gens eingeführt. Das PCR-Produkt und

das Plasmid pEGFP wurden mit den beiden Enzymen verdaut und die gereinigten DNA-Fragmente isoliert und ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* transformiert. Fünf leuchtende Kolonien wurden selektiert, kultiviert und sequenziert, um bei der PCR möglicherweise entstandene Punktmutationen auszuschließen. Es wurde ein Klon (pEGFP WtTag) ohne Mutationen kultiviert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

2.4.1.6 Fusion des HisTag an EGFP

Um die Leistung der gefundenen Peptidsequenzen zum Zweck der Affinitätschromatographie im Vergleich zum HisTag beurteilen zu können, wurde der HisTag N-terminal an EGFP fusioniert. Dabei wurde dieselbe Strategie wie in Kapitel 2.4.1.5 angewendet, wobei die Primer GFP_HIS_1 und GFP_WHO_2 eingesetzt wurden. Hier wurde ebenfalls ein Klon (pEGFP HisTag) ohne Mutationen selektiert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

2.4.1.7 Fusion des X_a-M13-HeliTag an EGFP

Um den HeliTag für die breite Anwendung insbesondere auch für pharmazeutische Proteine einsetzbar zu machen, ist die rückstandslose Entfernung des Tags vom Zielprotein wichtig. Der fusionierte Tag könnte zum einen unter Umständen die Eigenschaften des Proteins in einer nicht gewünschten Form verändern, zum anderen allergene Wirkungen induzieren oder verstärken.

Zur rückstandslosen Entfernung des Tags wurde zwischen EGFP und HeliTag eine Protease-schnittstelle eingeführt, die durch den in menschlichem Blut vorkommenden Faktor X_a mit der Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg gespalten wird. Diese Sequenz wurde gewählt, da die Protease X_a rückstandslos am Ile-Rest schneidet und diese sehr kurze Erkennungssequenz im EGFP nicht vorkommt. Die verwendete Klonierungsstrategie entspricht der in Kapitel 2.4.1.5. Es wurden jedoch die Primer GFP_Xa_M13_1 und GFP_Who_2 für die PCR verwendet. Nach der Ligation des PCR Produktes in den Expressionsvektor, der Transformation in *E. coli* und DNA-Sequenzierung wurde ein mutationsfreier Klon ausgewählt (EGFP X_a-M13 HeliTag).

Auch die mit EGFP X_a-M13 HeliTag transformierten *E. coli* Zellen exprimierten aktives EGFP (EGFP X_a-M13 HeliTag-Protein). Die Kultivierung dieses Klons und die nach der Lyse durchgeführte IMAC zeigte, daß die Fusion der X_a-Erkennungssequenz keinen Einfluß auf die Funktion des HeliTags M13 hatte.

2.4.1.8 Durchmusterung auf neue Peptidsequenzen zur IMAC (HeliTags)

Kolonien, die im UV-Licht grün fluoreszierten wurden selektiert und in Mikrotiterplatten in LB-Medium kultiviert. Nach der Herstellung einer Replikaplatte wurden die Zellen aufgeschlossen und der fluoreszierende Überstand in eine neue Platte überführt, um den Referenzwert zu bestimmen.

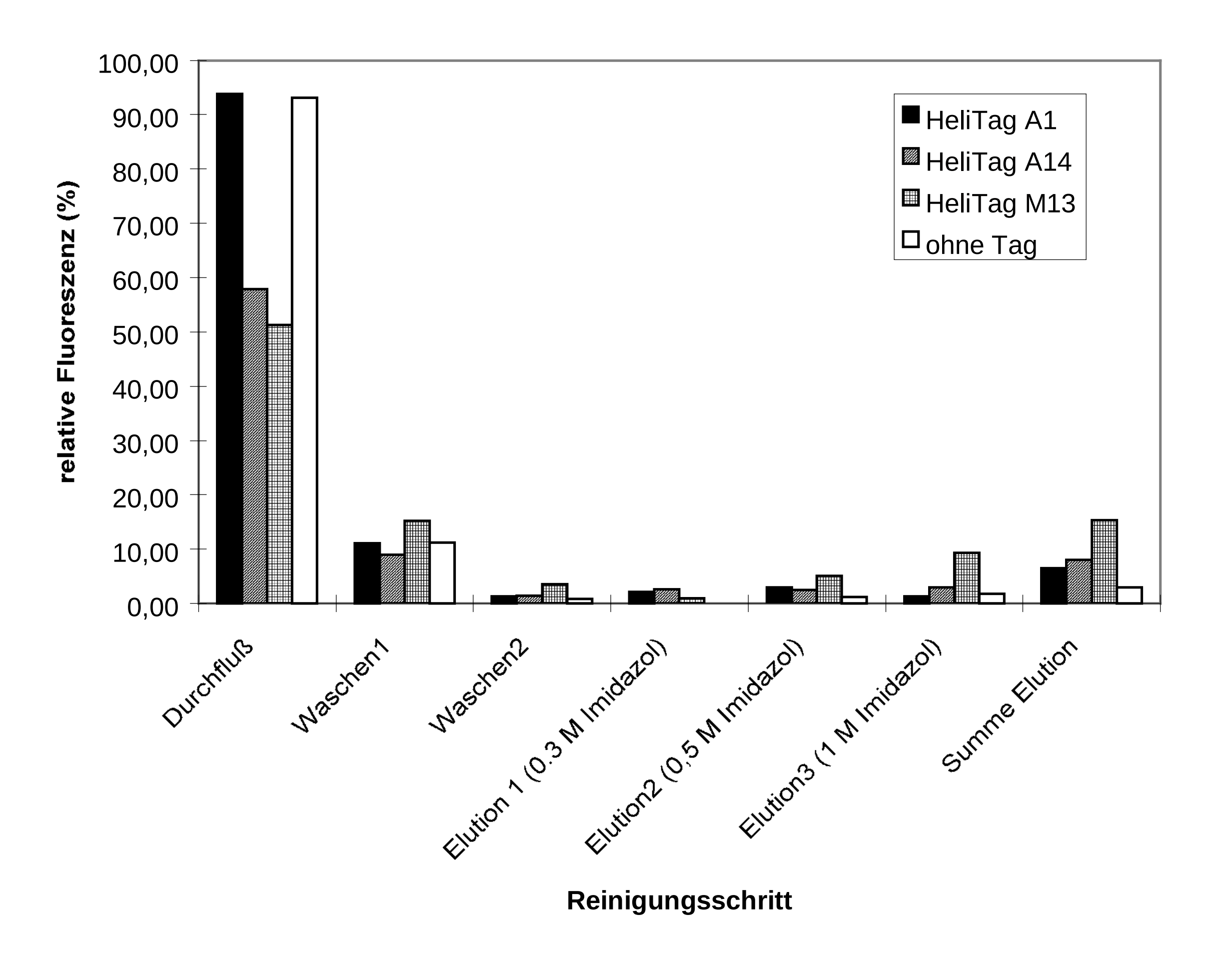

Abbildung 2.22: ***Medium Throughput Screening* (MTS) mit Qiagen Ni-NTA Säulen zur Validierung von HeliTags.**

Nach der IMAC Reinigung der einzelnen Mutanten in den Membranfilterplatten befüllt mit *Chelating Sepharose* (siehe 5.9) wurde die Fluoreszenz in den Wasch- und Elutionsschritten bestimmt. Hierbei wurden rund 1000 Mutanten durchmustert. Von diesen wurden die 25 besten HeliTags aus dem Plattentest ausgewählt und in einer genaueren Untersuchung in einem *Medium-Throughput Screening* Ansatz mit Ni-NTA Säulen (Qiagen) untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse gaben schon einen guten Aufschluß über Ausbeute und Elutionsverhalten der unterschiedlichen Tags, auch wenn selbst bei einem guten HeliTags 50 % des GFP ungehindert durch die Säule fließen (Abbildung 2.22).

Durch Verwendung von drei Elutionsschritten mit alternierender Imidazol-Konzentrationen konnten eindeutige Unterschiede zwischen dem Verhalten einzelner Tags, bzw. "ungetaggtem" Protein nachgeweisen werden. Die Reinigung des EGFP mit dem HeliTag M13 zeigt, daß schon mit den Ni-NTA Säulen von Qiagen eine sehr gute Reinigung möglich ist (Abbildung 2.23). Aus dem MTS wurde der HeliTag M13 als der vielversprechenste selektiert und weiter untersucht.

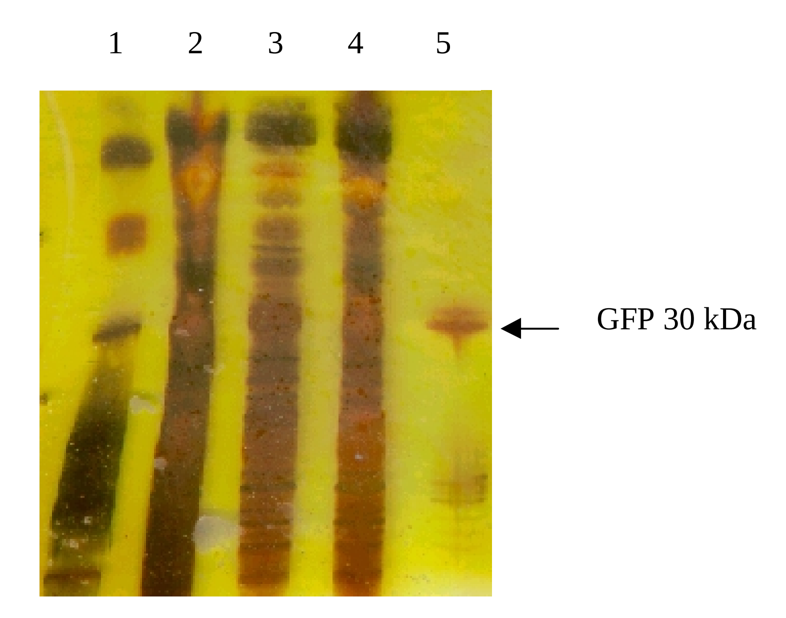

Abbildung 2.23: PHAST Gel der Reinigung von EGFP mit dem HeliTag M13 mit Ni-NTA-Säulen.

1 LMW Standard; 2 Aufschluß; 3 Durchfluß; 4 Waschen; 5 Elution.

2.4.1.9 Reinigung von EGFP fusioniert mit dem HeliTag M13 (HeliTag M13-EGFP)

Um die Eigenschaften des im *High-Throughput Screening* (HTS) gefundenen und im MTS schon verifizierten HeliTags M13 genauer zu untersuchen wurde HeliTag M13-EGFP in einer mit Chelating Sepharose gepackten Säule, durch FPLC gereinigt (Abbildung 2.24).

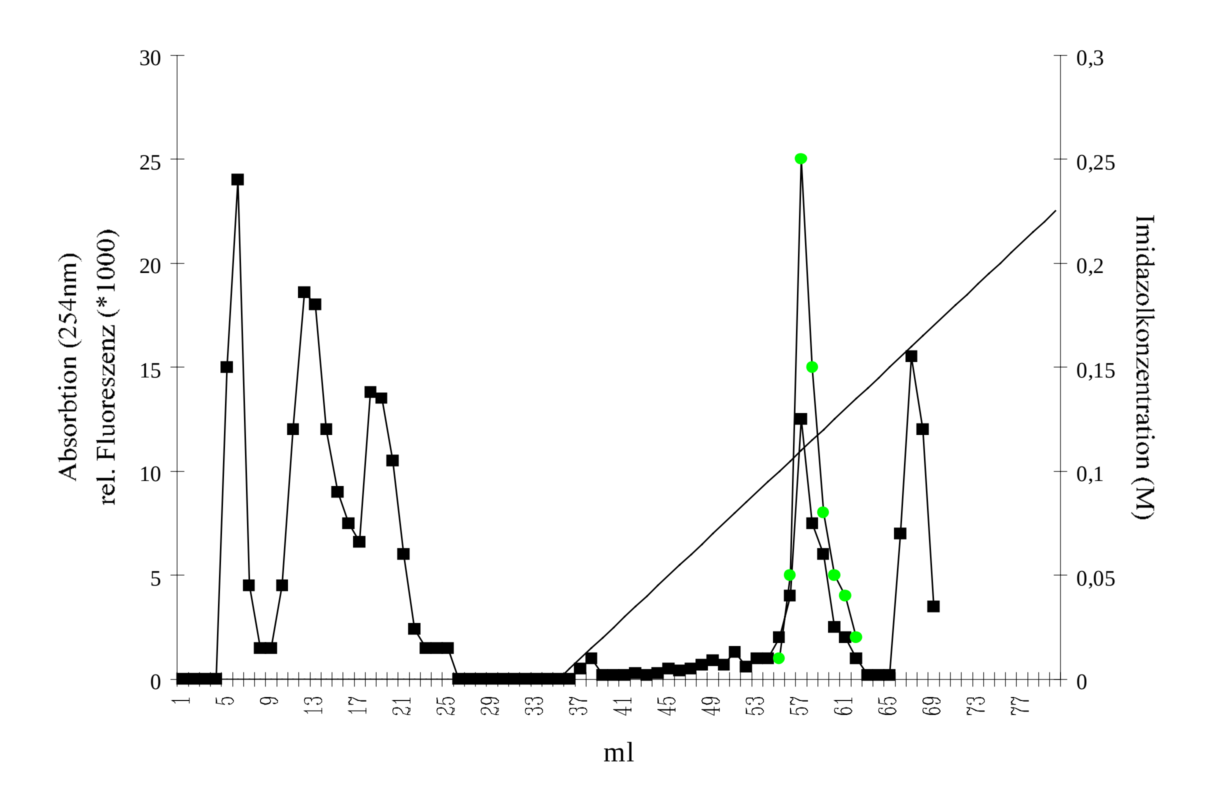

Abbildung 2.24: Verlauf der Metallaffinitäts-Reinigung von HeliTag M13-EGFP. Absorption (254 nm) (■), relative Fluoreszenz in den Fraktionen (●) (Die Aufzeichnung der Absorption über 70 ml hinaus war auf Grund der Eigenabsorption des Imidazols nicht mehr sinnvoll).

Der Einsatz dieser Apparatur ermöglichte die Verwendung eines linearen Imidazolgradienten und damit schonendere Bedingungen zur Elution. Wie Abbildung 2.25A qualitativ zeigt, band das HeliTag M13-EGFP vollständig im oberen Bereich der Säule. In den nachfolgenden Waschschritten konnte visuell kein HeliTag M13-EGFP mehr detektiert werden. Die gesamte Menge an EGFP wurde mit dem Gradienten eluiert und verteilte sich auf zwei Fraktionen (Abbildung 2.25B zeigt diese beiden Fraktionen in einem Reaktionsgefäß vereinigt). Dies

konnte auch quantititiv durch Fluoreszenzmessung der einzelnen Fraktionen gezeigt werden (Abbildung 2.24). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 2.26A, daß das "ungetaggte" Protein schon in den Fraktionen des Waschschritts die Säule wieder verläßt. Durch unspezifische Bindung verteilt es sich hier auf eine ganze Anzahl von Fraktionen (Abbildung 2.26B). Eine unspezifische Wechselwirkung des EGFP mit dem Säulenmaterial findet also nicht statt. Diese qualitativen Aussagen konnten auch durch die quantitative Bestimmung der Fluoreszenz in allen Fraktionen bewiesen werden (ohne Abbildung).

2.4.1.10 Untersuchung der Bindung von HeliTag M13-EGFP an verschiedene Metalle

Der His-Tag bindet an verschiedene Metalle. Neben Zn^{2+}, Ni^{2+} kann auch Cu^{2+} oder Fe^{2+} verwendet werden. Der HeliTag M13 zeigte sich in dieser Hinsicht wesentlich spezifischer. Die Bindung an Ni^{2+}-Ionen zur Verwendung des Tags in der IMAC wurde in den vorherigen Kapiteln schon erläutert. Wurde Zn^{2+} zur IMAC verwendet, wurde HeliTag M13-EGFP schon im Waschschritt oder bei sehr geringen Mengen Imidazol eluiert. Bei der Verwendung von Cu^{2+} konnte eine wesentlich stärkere Bindung festgestellt werden, als bei Ni^{2+}. Die Bindung war sogar so stark, daß bei der Elution Cu^{2+}-Ionen mitgerissen wurden. Dies konnte durch die typisch dunkelblaue Farbe des Imidazol-Kupfer Komplexes in der proteinhaltigen Fraktionen geschlossen werden. Eine reproduzierbare Fluoreszenzmessung war aus diesem Grund nicht möglich.

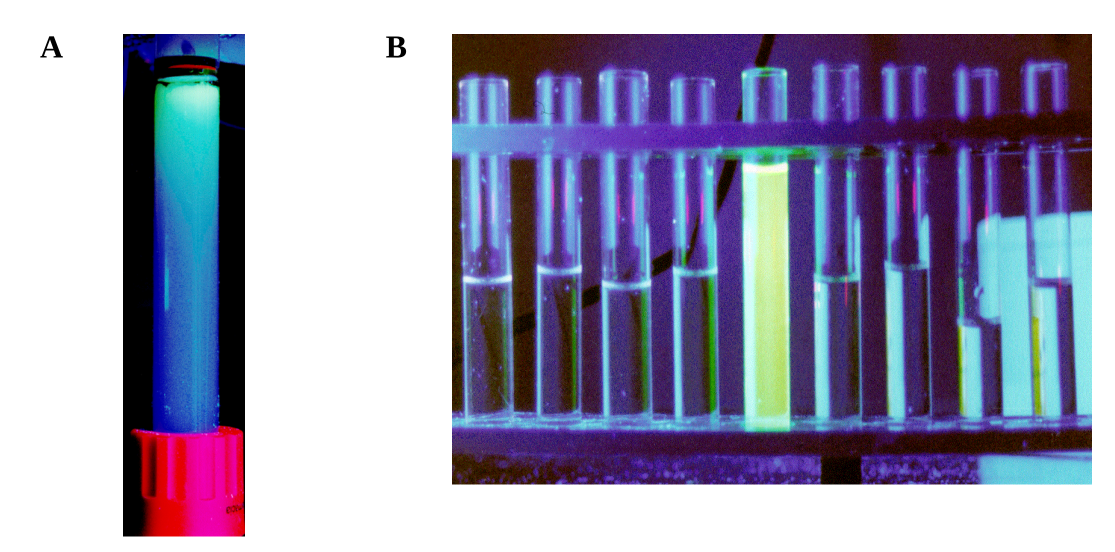

Abbildung 2.25: Reinigung von HeliTag M13-EGFP durch IMAC.

Abbildung 2.25A zeigt die Bindung des EGFP nach dem Waschschritt auf der Säule. Abbildung 2.25B zeigt verschiedene Fraktionen der Elution. Es kann nur in zwei Fraktionen visuell EGFP detektiert werden (im Bild in einem Reagenzglas vereinigt.).

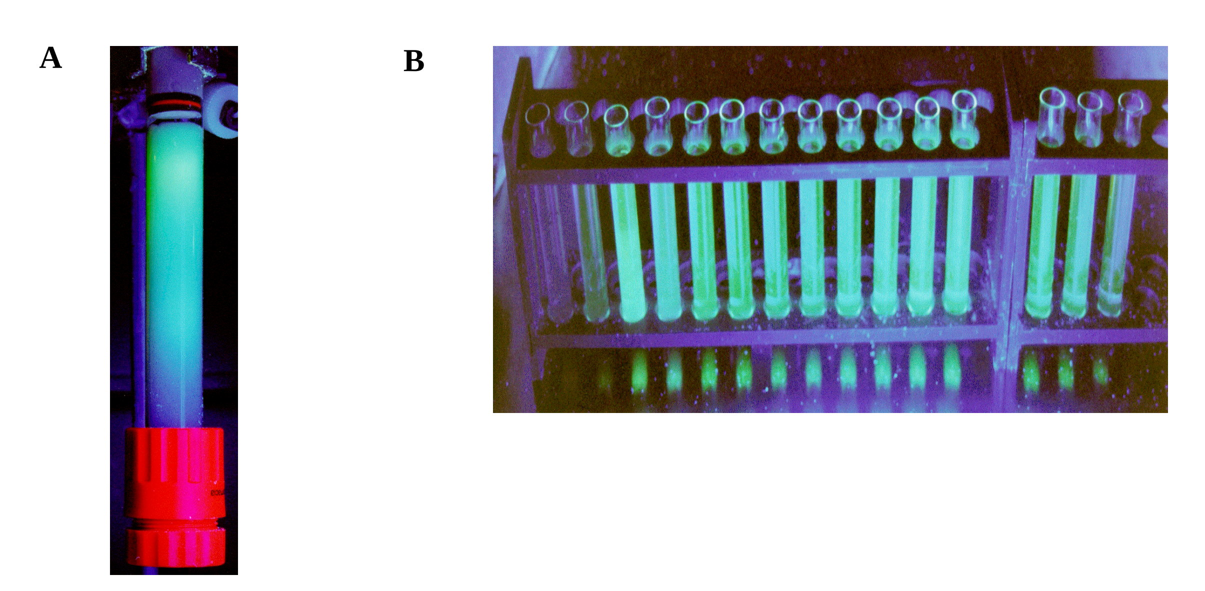

Abbildung 2.26: Verhalten von EGFP ohne Tag bei der IMAC.

Abbildung 2.26A zeigt die Elution des EGFP während des Waschschritts ohne spezifische Bindung. Abbildung 2.26B zeigt die Verteilung des EGFP während des Waschschrittes in viele Fraktionen.

2.4.1.11 Vergleich des HeliTags M13 und HeliTag X_a M13 mit der Wildtyp-Sequenz und dem His-Tag

Der His-Tag ist in der Metallaffinitätschromatographie am weitesten verbreitet. Er ist mit nur sechs Aminosäuren sehr kurz und außerdem breit einsetzbar. Eine ganze Reihe verschiedenster Proteine konnten schon mit dem HisTag aufgereinigt werden. Dies umso mehr, da heutzutage häufig (kommerzielle) Expressionsvektoren eingesetzt werden, die schon die für den His-Tag kodierende Sequenz enthalten. Dies trägt zur weiteren Verbreitung des His-Tags bei. Ein neu entwickelter Tag muß sich also an der Leistungsfähigkeit des His-Tags messen lassen und gegenüber diesem verbesserte Eigenschaften aufweisen. Beispiele für eine verbesserte Eigenschaft sind z. B. höhere Ausbeuten an Protein, mildere Reinigungsbedingungen, höhere Selektivität und breitere Einsetzbarkeit (sowohl in verschiedenen Expressionssystemen, wie auch für verschiedene Proteine).

Tabelle 2.7: Vergleich der Ausbeute und der Elutionsbedingungen der verschiedenen Affinitätspeptide fusioniert an EGFP

Affinitätspeptid	Minimale Konzentration an Imidazol zur Elution (M)	Ausbeute (%)
HeliTag M13	0,1	68
HeliTag X_a-M13	0,1	63
His_6Tag	0,05	48
WtHeliTag	0,25	68

Die hier entwickelten HeliTag M13 bzw. HeliTag X_a M13 wurden deswegen mit dem His-Tag und der WtHeliTag Sequenz der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori* verglichen. Es zeigte sich, daß sowohl mit dem HeliTag M13 (mit und ohne X_a), wie auch mit dem WtHeliTag eine verbesserte Ausbeute an EGFP, als mit dem HisTag erreicht werden konnte. Die Reinheit der Proteine hingegen war bei beiden Reinigungsversuchen vergleichbar. Durch die stärkere Bindung der HeliTags-Fusionsproteine an die Matrix mußte jedoch eine höher konzentrierte Imidazol-Lösung verwendet werden.

2.4.1.12 Entfernung des HeliTags M13 durch Behandlung von EGFP X_a-M13 HeliTag-Protein mit Faktor X_a

Die Entfernung eines Tags nach der Reinigung ist mitunter unentbehrlich, insbesondere bei pharmazeutischen Proteinen. Aus diesem Grund wurde eine Erkennungssequenz für den Faktor X_a zwischen EGFP und den HeliTag M13 (HeliTagX_aM13-EGFP) kloniert (siehe Kapitel 2.4.1.7). Da die N-terminale Sequenzierung des mit Faktor X_a gespaltenen HeliTag-X_aM13-EGFP scheiterte, wurde die erfolgreiche Abspaltung des Proteins durch ein einfaches Experiment bewiesen. HeliTagX_aM13-EGFP wurde unter den üblichen Bedingungen durch eine IMAC gereinigt (IMAC 1) und das in den Fraktionen mit HeliTagX_aM13-EGFP enthaltene Imidazol wurde durch eine zweifache Dialyse gegen IMAC-Puffer entfernt und der Ansatz geteilt. Eine dieser Fraktionen wurde mit Faktor X_a behandelt und beide Fraktionen über Ni-NTA-Säulen nochmals gereinigt (IMAC 2).

Tabelle 2.8: Nachweis der erfolgreichen Abspaltung des X_a-M13 HeliTags von EGFP

Reinigungsschritt	relative Fluoreszenz (%)
HeliTagX_aM13-EGFP	159
HeliTagX_aM13-EGFP nach IMAC 1	100
HeliTagX_aM13-EGFP nach Dialyse	86
HeliTagX_aM13-EGFP ohne Behandlung mit X_a nach IMAC 2	18
HeliTagX_aM13-EGFP nach Behandlung mit X_a nach IMAC 2	2

Dabei lief das mit Faktor X_a behandelte Protein beim Auftragungs- bzw. Waschschritt durch die Säule, während das nicht behandelte Protein wie erwartet auf der Säule zurückgehalten wurde und erst bei der Behandlung mit Imidazol eluiert werden konnte (siehe Tabelle 2.8). Da zuvor gezeigt wurde, daß EGFP ohne fusionierten Tag nicht in der Lage ist spezifisch an die Matrix zu binden, zeigt dieses Experiment die erfolgreiche Abspaltung des HeliTags vom EGFP.

2.4.2 Fusion der ROL aus *Pichia pastoris* mit dem HeliTag

2.4.2.1 Klonierung des HeliTags M13 mit und ohne X_a-Protease-Schnittstelle an das N- und C-terminale Ende der ROL

Die Fusion der HeliTag M13 Sequenz an das 3´-terminale Ende des ROL-Gens erfolgte mit den Primern ROL_Eco1 und ROL_C_Tag2 bzw. ROL_C_X_a_Tag2 zur Fusion des Tags mit der X_a-Schnittstelle. Zur Fusion des HeliTags an das 5´-terminale Ende wurden die Primer ROL_N_Tag1 und ROL_Not2 verwendet. Bei der Fusion des Tags an das C-terminale Ende der ROL wurde die Peptidsequenz des HeliTags invertiert, d. h. daß ebenso wie am N-terminalen Ende das erste Histidin das Ende des Proteins bildet, da die Bindung des invertierten HeliTags (mit Cystein am N-terminalen Ende) in der Fusion mit EGFP nicht untersucht wurde (Abbildung 2.27).

ROL	**C**CG**C**GYR**H**N**H** HeliTag M13

ROL	RGEI X_a	**C**CG**C**GYR**H**N**H** HeliTag M13

HN**H**RYG**C**GC**C** HeliTag M13	ROL

Abbildung 2.27: Schematische Darstellung der verschiedenen ROL-Konstrukte mit dem HeliTag M13.
HeliTagM13 C-terminal ohne (oben) und mit (Mitte) Faktor-X_a Schnittstelle sowie N-terminal (unten).
Die Konstrukte sind so dargestellt, daß sich der N-Terminus links, der C-Terminus rechts befindet. Die Reihenfolge der Aminosäuren des HeliTags am C-terminalen Ende wurde invertiert, um die Fusion des ersten Cysteins an das Ende der ROL Sequenz zu erreichen.

Es wurden dieselben Restriktionsenzyme zur Klonierung der PCR Produkte in pPICZαA verwendet, wie in Kapitel 2.4. Die drei Konstrukte pPICZαA_ROL_HeliN, mit dem HeliTag

am N-terminalen Ende, pPICZαA_ROL_HeliC, mit dem HeliTag am C-terminalen Ende und pPICZαA_ROL_X_aHeliC mit die Proteaseschnittstelle für den Faktor X_a wurden durch Sequenzierung überprüft, in *Pichia pastoris* transformiert und je fünf Klone kultiviert.
Bei der Kultivierung der mit pPICZαA_ROL_HeliC und pPICZαA_ROL_X_aHeliC transformierten *Pichia* Kulturen konnte keine Aktivität festgestellt werden (auch eine Wiederholung der Transformation und erneute Kultivierung von je fünf Klonen resultierte in keinerlei Lipase Aktivität in den Überständen). Auch die Behandlung der Überstände von pPICZαA_ROL_X_aHeliC mit dem Faktor X_a zur Abspaltung des Affinitätspeptids erbrachte keine Lipaseaktivität im Überstand.
Mit pPICZαA_ROL_HeliN transformierte Klone zeigten Lipaseaktivität, diese erreichte jedoch nur zwischen 5-10 % der Aktivität von Klonen ohne fusionierten Tag.
Da die niedrige Aktivität in diesem Fall den Vorteil der einfachen Aufreinigung aufwiegt, wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesen Überständen durchgeführt.

3 Diskussion

3.1 Klonierung der reifen ROL in *Pichia pastoris* Expressionsvektoren und Transformation in *Pichia pastoris*

3.1.1 Klonierung und Transformation des ROL Gens in *Pichia pastoris*

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine ganze Reihe verschiedenster Proteine in diesem Expressionssystem, mit oder ohne α-Faktor zur Sekretion, in aktiver Form exprimiert (siehe Kapitel 1.2.2.2). Neben der stabilen Integration in das *Pichia pastoris* Genom, die keinen Zusatz von Antibiotika während der Kultivierung erfordert, sind insbesondere die hohen Expressionsraten ein Vorteil dieses Systems.

Die Lipase aus *Rhizopus oryzae* wurde in einer früheren Arbeit von Beer *et al.* aus einer partiellen chromosomalen Genbank in *E. coli* kloniert und unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors (siehe Abbildung 2.1) exprimiert (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998). Die Produktion der Lipase in *E. coli* führt jedoch zur Bildung von inaktiven *Inclusion Bodies* die erst in einer zeitaufwendigen Refolding-Prozedur renaturiert werden müssen. Der Erfolg dieser Renaturierung erfordert zumindest in einem Schritt hohe Puffervolumina, was die Methode für die Aufreinigung eines größeren Kultivierungsansatzes (>1 l) ungeeignet erscheinen ließ. Um diese Probleme zu umgehen, wurde der von Beer *et al*. hergestellte Vektor als Ausgangspunkt für die Klonierung und Expression der reifen ROL in *Pichia pastoris* verwendet.

Das Gen der reifen ROL wurde aus diesem Expressionsvektor mittels PCR durch geeignete Primer isoliert und in zwei *E. coli*/*P. pastoris*-Schaukelvektoren (pPICZαA und pGAPZαA) kloniert. Die Vektoren unterschieden sich in den zur Kontrolle der ROL-Expression verwendeten Promotoren und ihrem Integrationsort in der Hefe. Während in pGAPZαA die Expression des heterologen Gens konstitutiv erfolgt, ist bei pPICZαA die gezielte Induktion der Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt möglich.

Dies ist insbesondere deshalb von Interesse, da von Beer *et al.* eine toxische Wirkung der Lipase in *E. coli* vermutet wurde (Beer 1994), auch wenn diese von Haalck *et al.* (Haalck, *et al.* 1997) nicht bestätigt werden konnte.
Das für die ROL kodierende Gen konnte erfolgreich in beide Vektoren kloniert und in zwei *Pichia pastoris*-Stämme (mit und ohne Histidin-Auxotrophie) transformiert werden.

3.1.2 Untersuchung und Variation verschiedener Transformationsmethoden in *Pichia pastoris*

Bei der Transformation der Plasmide in die Hefe machte sich die extrem niedrige Transformationseffizienz negativ bemerkbar. In der Regel konnten nicht mehr als 5-10 Kolonien pro Platte erreicht werden. Positiv war, daß durch die Verwendung von Zeocin als Selektionsmittel, alle Antibiotika resistenten Transformanten dann auch wirklich ROL aktiv sekretierten. Im Gegensatz dazu wurde für Plasmide, die das his 4 Gen zur Selektion verwenden, von 10-50 % falsch positiven Transformanten durch Rekombination des his 4 Genes vom Plasmid in das *Pichia*-Genom unter Verlust der restlichen Plasmid-DNA berichtet (Higgins und Cregg 1998).
Da die niedrige Transformationseffizienz den Einsatz dieser Hefe z. B. für Zufallsmutagenese oder gerichtete Evolution verhindert, aber auch die Expression von Wildtyp- und rational mutierten Proteinen erschwert wurden weitere Transformations-Methoden in *Pichia pastoris* untersucht. So macht die auftretende klonale Variation und die spontane Integration mehrerer Genkopien in die Hefe das Durchmustern einer Reihe von Klonen zur optimalen Expression erforderlich (siehe unten, (Romanos, *et al.* 1998)).
Die vom Hersteller (Invitrogen) angegebene Prozedur mittels Elektroporation hat neben der niedrigen Transformationseffizienz den Nachteil, daß man die Hefe exakt bis zu einer OD_{600} von 1,3 kultivieren muß. Geringe Abweichungen hierbei führten sofort zu noch weniger, häufig sogar gar keinen Transformanten. Ansonsten ist die Methode jedoch gut für die Transformation geeignet, da das weitere Vorgehen unproblematisch und schnell durchzuführen ist.
Die zweite Methode, ein kommerzielles Kit (Easy Comp; Invitrogen), führte ebenfalls zu Transformanten, allerdings konnten höchstens 1-2 Kolonien pro Transformationsansatz erzielt werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, kompetente Zellen einzufrieren und diese bei Bedarf aufzutauen und zu verwenden. Die extrem niedrigen Transformations-

effizienzen reduzieren jedoch den Wert dieser Methode deutlich. Es wurde weiterhin die Transformation der DNA nach der Methode von Gietz *et al.* (Gietz, *et al.* 1995) untersucht. Diese Methode wurde für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und wird dort mit hoher Transformationseffizienz (mehrere 100 Kolonien pro Transformation) eingesetzt. Laut Angeben des Herstellers kann *Pichia pastoris* im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* nicht durch Verwendung von Lithiumacetat transformiert werden, sondern es muß Lithiumchlorid verwendet werden. Es wurden verschiedene Transformationsansätze mit beiden Salzen gemacht, keiner erbrachte jedoch einen positiven Transformanten.
Als vierte Alternative wurde eine vereinfachte Variation der Elektroporationsmethode verwendet. Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden auf eine OD_{600} von 1,0 ml^{-1} verdünnt und elektroporiert.
Insbesondere die hohe Transformationseffizienz von 100-200 Klonen pro Transformation waren der große Vorteil dieser Methode neben der vereinfachten Handhabung der kompetenten Zellen gegenüber dem Protokoll von Invitrogen.
Mit dieser Transformationsmethode konnte eine der Engstellen in der Expression von Proteinen in *Pichia pastoris* - zumindest für die Expression von Wildtyp-Proteinen und rationalen Mutanten - beseitigt werden. Bezüglich gerichteter Evolution und Zufallsmutagenese sind die erreichten Effizienzen jedoch immer noch zu niedrig.

3.2 Vergleich der Expression der ROL in *Pichia pastoris* unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren

Die ROL konnte sowohl unter der Kontrolle des konstitutiven GAP-Promotor, als auch dem induzierbaren AOX1 Promotors erfolgreich exprimiert werden. Die reife Lipase wurde in beiden Fällen durch die Fusion an den α-Faktor in das Medium sekretiert. Die Expressionsraten der einzelnen selektierten Klone eines Transformationsansatzes unterschieden sich sehr stark. Grund hierfür kann sowohl die Anzahl der insertierten Genkopien sein (Romanos, *et al.* 1998), wie auch ein Phänomen, das klonale Variation genannt wird. Hierbei scheint u. a. der Integrationsort eine Rolle zu spielen (Cregg, *et al.* 1993). Generell konnte jedoch beobachtet werden, daß die Expressionsrate unter Kontrolle des GAP-Promotors mit 60 U ml^{-1} um ca. 50 % geringer ausfiel, als unter Kontrolle des AOX1-Promotors mit bis zu 110 U ml^{-1}. Dabei scheint die von Beer postulierte Toxizität keine Rolle gespielt zu haben, da sich beim

Wachstum der Zellen keine Auffälligkeiten zeigten. Die am Ende erreichte Zellmasse war sogar höher, als die unter pPIC-Kontrolle. Unter Umständen könnte sogar das verstärkte Wachstum ein Grund für die geringere ROL Expression sein.

3.3 Optimierung der Kultivierungsbedingungen für *Pichia pastoris* zur Produktion von ROL unter Kontrolle des AOX1-Promotors

Obwohl es schon eine ganze Reihe von Veröffentlichungen zur Fermentation von *Pichia pastoris* gibt (Review: (Stratton, *et al.* 1998)), müssen für jedes Protein die Bedingungen, insbesondere die Fütterungsstrategie, sowie pH, Medienbestandteile usw. neu optimiert werden.

Dabei ist insbesondere die Bestimmung des Phänotyps hinsichtlich der Verwertung von Methanol von entscheidender Bedeutung, da von ihm die eingeschlagene Fütterungsstrategie, insbesondere in synthetischem Medium bei kontinuierlicher Fütterung, abhängt. Der Vergleich der Wachstumsraten der transformierten Zellen in Glycerin bzw. Methanol ergab, daß alle zehn getesteten Klone dem Mut^S-Phänotyp (Methanol sensitiv) angehörten, d. h. daß das für Alkoholoxidase I kodierende Gen während der Integration deletiert wurde, ein Vorgang, der laut Literatur statistisch nur bei 10-20 % der Transformanten auftreten sollte (Cregg 1999).

Dies ist jedoch nicht unbedingt ein Nachteil, da auch schon höhere Expressionsraten bei Mut^S-Phänotypen beobachtet wurden (Cregg, *et al.* 1987). Allerdings ist bei Mut^S-Phänotypen eine genauere Analyse des Methanolgehaltes in der Kulturbrühe notwendig (siehe unten).

Bei der Expression der ROL im Fermenter stellte sich heraus, daß in komplexem Medium durch eine einfache Fütterungsstrategie aktive Lipase hergestellt werden kann. Wurde in der ersten Fermentation durch Füttern von 1% (v/v) Methanol alle 24 h die Ausbeute mit 110 U ml^{-1} gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben nicht gesteigert, führte die Analyse des CO_2-Anteils im Abgas (Fütterung, wenn der CO_2-Gehalt im Abgas sank) schon zu einer verbesserten Ausbeute von 180 U ml^{-1}. Diese Analyse stellte sich jedoch als fehleranfällig heraus, da der Anteil von CO_2 im Abgas, abhängig von der zugeführten Luft, Schwankungen unterlag. Deshalb wurde in Fermentation 3 die Zugabe von Methanol zur Induktion und Fütterung vom gelösten Sauerstoff (DO-Wert) in der Fermenterbrühe abhängig gemacht. Jedesmal, wenn das Methanol verbraucht war, konnte dies durch einen signifikanten Anstieg des DO-

Gehalts detektiert werden. Die darauf folgende Zugabe von Methanol führte zum unmittelbaren Absinken des DO. Außerdem wurde vor der Induktion mit Methanol Glycerin (1 % (v/v)) zugegeben, um die Zellmasse zu erhöhen. Mit dieser vergleichsweise einfachen Strategie konnte die Ausbeute an aktiver Lipase (Aktivität 500 U ml^{-1}) gegenüber der Zugabe von Methanol alle 24 h nahezu verfünffacht werden.

Die Kultivierung in komplexem Vollmedium ist jedoch teuer. Um die Kosten für die ROL Produktion zu verringern, die Markierung der ROL mit verschiedenen Isotopen zu ermöglichen (Laroche, *et al.* 1994, Wood und Komives 1999) und die Ausbeute weiter zu steigern, wurde ein definiertes synthetisches Minimalmedium verwendet.

Die bei Fermentation 3 erfolgreich angewendete Fütterungsstrategie (Fütterung bei Absinken des DO-Wertes) sollte auf die anschließende Fermentation in synthetischem Medium übertragen werden. Hierbei stellte sich heraus, daß mit der Batch-Fütterung, abhängig vom DO-Gehalt, keine oder nur eine minimale Lipaseaktivität im Medium nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Deshalb wurden die weiteren Fermentationen mit kontinuierlicher Fütterung von Methanol durchgeführt.

In Fermentation 4 wurde ein vom Hersteller (Invitrogen) vorgeschlagenes Profil für die Fütterung übernommen. Gleichzeitig wurde untersucht, ob auch in diesem Fall die Methanol-Konzentration in der Lösung mit dem im Fermenter gelösten Sauerstoff korreliert werden kann, wie bei Fermentation 3 beschrieben.

Die Analyse des Methanolgehaltes der Proben im GC zeigte jedoch, daß die DO-Werte zum Teil anstiegen, obwohl die tolerierbare Methanol-Konzentration der Kulturbrühe von 1 % (v/v) überschritten war. Dieser Parameter konnten also bei den vorliegenden *Pichia pastoris* Transformanten mit Mut^S-Phänotyp (siehe oben) nicht zur Steuerung der Fütterungsrate verwendet werden, obwohl das für Mut^+-Phänotyp beschrieben wurde (Stratton, *et al.* 1998). Da im Verlauf der Fermentation Methanolkonzentrationen bis zu 1,6 % (v/v) auftraten, konnte am Ende der Fermentation nur 120 U ml^{-1} Lipaseaktivität im Überstand erhalten werden.

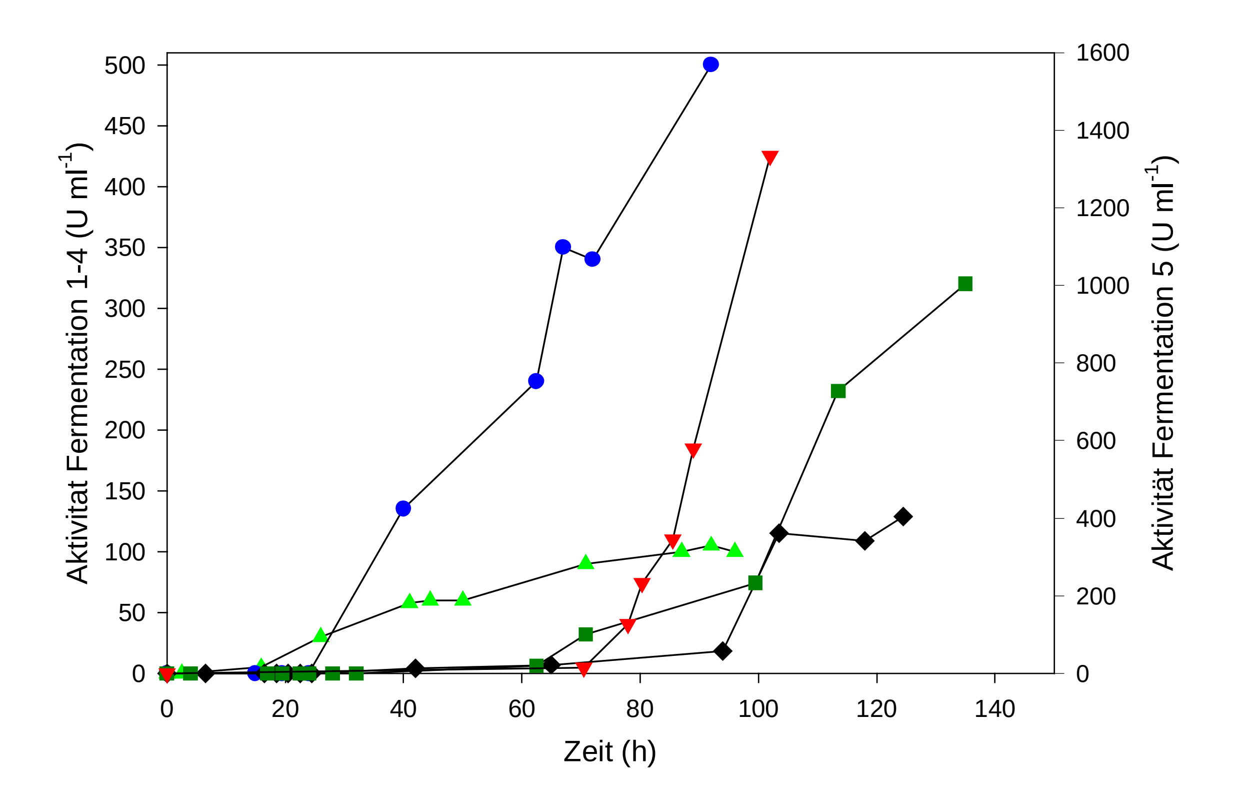

Abbildung 3.1: Vergleich des Auftretens von Lipaseaktivität im Fermenterüberstand bei Kultivierung in komplexem Medium (Fermentationen 1 + 3) und synthetischem Medium (Fermentationen 4 + 5 + 6).

Fermentation 1: komplexes Medium, Fütterung alle 24 h (▲), Fermentation 3: komplexes Medium Fütterung abhängig von DO (●), Fermentation 4: synthetisches Medium ohne MeOH Analytik (■), Fermentation 5: synthetisches Medium mit MeOH Analytik (◆), Fermentation 6: synthetisches Medium mit Glycerin/MeOH-Mischfütterung zu Beginn der Fermentation(▼, zur besseren Übersichtlichkeit wurde für diese Kurve ein anderer Maßstab, als für die anderen gewählt).

Folglich wurde zur Bestimmung der Methanolkonzentration eine GC-Methode entwickelt. Sie kann zwar nicht direkt *online* zur Steuerung der Fütterung verwendet werden, die einfache Probenvorbereitung und die schnelle Analysezeit von rund 15 Minuten ermöglicht jedoch eine Konzentrationsbestimmung alle 30 Minuten bis 1 h. Dies reicht zur Verfolgung des Methanolgehaltes bzw. zur Bestimmung der Fütterungsrate in der Fermentation vollständig aus. Wie Abbildung 2.11 zeigt, konnte die Ausbeute an aktiver Lipase durch die regelmäßige Bestimmung des Methanolgehaltes in der Fermentation 5 auf 320 U ml^{-1} gesteigert werden.

Bei beiden Fermentationen 4 und 5 fiel das gegenüber Fermentation 1 und 3 erst sehr spät einsetzende Auftreten von lipolytischer Aktivität im Fermenterüberstand auf. Um diese Zeit zu verkürzen, wurde in Fermentation 6 schon während der Fütterung mit Glycerin zu Beginn der Kultivierung Methanol zugegeben (Mischfütterung).

Erstaunlicherweise verkürzte sich die Zeit bis zum Auftreten von Lipaseaktivität jedoch kaum, allerdings nahm die Aktivität im Fermenterüberstand wesentlich schneller zu, als in allen anderen Fermentationen zuvor, und es wurde außerdem die bisher höchste Lipaseaktivität von 1334 U ml^{-1} erreicht (siehe Abbildung 3.1). Dies deutet darauf hin, daß die Zeit bis zum Auftreten von Lipaseaktivität in synthetischem Medium durch die Fütterung nicht wesentlich vermindert werden kann, möglicherweise benötigt die Hefe diese Zeit, um die Lipase zu sekretieren.

Vergleicht man die Fütterungsraten der Fermentationen 3, 4 und 5 (Abbildung 2.12) so zeigt sich, daß eine sehr geringe Methanolmenge am Anfang essentiell für eine erfolgreiche Kultivierung ist.

Tabelle 3.1: Vergleich der wichtigsten Daten der Fermentationen 1-6

Nr.	Medium	Fütterungsstrategie	Zeit (h)	BWW (g l^{-1})	Aktivität (U ml^{-1})	Produktivität (U l^{-1} h^{-1})
1	komplex	batch (alle 24 h)	100	40	100	1000
2	komplex	batch (CO_2-abhängig)	90	45	135	1500
3	komplex	batch (D.O.-abhängig)	93	58.6	500	5380
4	synthetisch	kontinuierlich (nach Invitrogen)	135	100	120	890
5	synthetisch	kontinuierlich (MeOH-abhängig)	138	150	320	2320
6	synthetisch	kontinuierlich (MeOH/Glycerin-abhängig)	104	n. d.	1334	12826

Letztendlich konnte bei der Kultivierung in günstigem, synthetischem Medium eine wesentlich höhere Ausbeute an aktiver ROL erreicht werden, als im kostenintensiveren komplexen Medium. Die Expression der ROL in *Pichia pastoris* erbrachte eine wesentlich bessere Ausbeute an aktiver Lipase als in *Escherichia coli* und benötigt außerdem wesentlich weniger Reinigungsschritte. Diese Vorteile wiegen eindeutig den höheren Aufwand an Zeit auf, den man bei der Hefe gegenüber der Bakterienkultivierung hat.

3.4 Vergleich der Eigenschaften von ROL und ProROL produziert in *Rhizopus oryzae*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*

Bei der intrazellulären Expression von ROL in *E. coli* ist durch die Bildung von inaktiven *Inclusion Bodies*, eine Renaturierungs-Prozedur nötig. Diese wird durch den Umstand erschwert, daß drei Cystein-Brücken richtig geknüpft werden müssen, um ein aktives Protein zu erhalten. Es ist also während der Faltung nötig die falsch geknüpften Schwefelbrücken erst reduktiv zu spalten um sie dann oxidativ wieder zu knüpfen. Bei der Expression in Hefe gelang es Takahashi *et al*. ein Gemisch aus ProROL und Pro(28)ROL in *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren und in das Medium zu sekretieren (Takahashi, *et al.* 1998). Diese Mischung ist jedoch in ihren Eigenschaften nicht mit der nativen ROL identisch und muß deshalb als eigenständiges Enzym betrachtet werden (siehe unten).
In dieser Arbeit wurde die Expression der reifen ROL in *Saccharomyces cerevisiae* unter Kontrolle des GAL1 Promotors untersucht. Es konnte jedoch nur eine schwache Lipaseaktivität im Überstand detektiert werden, die für weitergehende Untersuchungen viel zu gering war.
Durch die Verwendung von *Pichia pastoris* als Expressionssystem konnte in dieser Arbeit die aktive, reife Lipase aus *Rhizopus oryzae* in das Medium sekretiert werden mit einer Ausbeute von 156 mg l^{-1} aktiver Lipase (gereinigt 68 mg l^{-1}), die sogar um ein vielfaches höher ist wie die bei der Expression in *E. coli* (10-15 mg l^{-1} aktive, gereinigte Lipase; siehe Tabelle 3.2). Das Ziel, die Expression der Lipase in größerem Maßstab zu ermöglichen konnte also erreicht werden, da der Maßstab nur noch vom Fermentervolumen bestimmt wird.

Zum Vergleich der Eigenschaften der in verschiedenen Mikroorganismen exprimierten ROL und ProROL wurde die gereinigte reife ROL aus *E. coli* (hergestellt nach: (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998) mit der im Schüttelkolben kultivierten und ebenfalls gereinigten ROL aus *Pichia pastoris* mit Daten aus der Literatur verglichen.

In der SDS PAGE zeigten die rekombinaten ROL aus *Pichia pastoris* und *E. coli* ein nahezu identisches Laufverhalten, entsprechend einer Molmasse von ca. 30 kDa (Beer, *et al.* 1998), das der für die native RDL, bzw. für die rekombinante RDL aus *E. coli* beschriebenen entspricht (Haas, *et al.* 1992, Joerger und Haas 1993). Durch die Klonierung in *Pichia pastoris* wurden zwei zusätzliche Aminosäuren eingeführt, weshalb diese geringfügig schwerer ist. Der möglicherweise glykosylierten nativen Lipase aus der Kultivierung von *Rhizopus oryzae* wurde von Ben Salah *et al.* eine Bande im SDS Gel bei 32 kDa zugeordnet (Ben Salah, *et al.* 1994).
Die Deglykosylierung der Lipase aus *Pichia pastoris* zeigte aus der Kultivierung im Schüttelkolben, daß, obwohl drei mögliche N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) vorliegen, hier keine Glykosylierung erfolgte. Bei der Kultivierung im Fermenter hingegen scheint ein kleiner Anteil der Lipase glykosyliert zu werden, da bei ca. 32 kDa eine Bande auftritt, die bei Inkubation mit Endo H verschwindet (Serrano, persönliche Mitteilung). Eine partielle Glykosylierung in *Pichia pastoris* wurde schon für die Expression des ankerlosen Oberflächenantigens 1 (*Surface antigen*; SAG1) aus *Toxoplasma gondii* beschrieben (Biemans, *et al.* 1998), jedoch nicht erklärt. Dies ist auch schwierig, insbesondere deshalb, weil andere Lipasen aus Pilzen wie z. B. der Lipase aus *Candida rugosa* (Lip 1) (Brocca, *et al.* 1998) bzw. der Lipase aus *Geotrichum candidum* (Lip A u. B) (Catoni, *et al.* 1997), vollständig glykosyliert exprimiert wurden. Da jedoch bei der Kultivierung im Schüttelkolben keine, zumindest im SDS Gel detektierbare Glykosylierung auftritt, könnte der Expressionslevel entscheidend für das Auftreten von glykosyliertem Protein sein.
Weder der isoelektrische Punkt der rekombinanten ROL aus *E. coli* noch der aus *P. pastoris* konnte mit der vorhandenen Ausrüstung genau bestimmt werden. Die Bande der Lipase liegt oberhalb des Maximalwertes von 9,3. Damit unterscheiden sich die rekombinanten Lipasen vom Wildtyp (RDL) für den ein isoelektrischer Punkt von 8,6 berichtet wurde (Haas, *et al.* 1992) und von dem theoretisch berechneten Wert von 8,3 (Bornscheuer, *et al.* 1999). Eine Übersicht der wichtigsten Eigenschaften der ProROL und ROL exprimiert in verschiedenen Mikroorganismen zeigt Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Vergleich der verschieden Lipasen der Famile *Rhizopus* sp.

	ROL Nativ[1]	ROL *E. coli*[2]	ROL *P. pastoris*	ProROL[b] *S. cerevisiae*[3]	ProROL *E. coli*[4]	RDL Nativ[5]	RDL *E. coli*[6]	ProRDL[7] *E. coli*[6]
Prozessierung zur reifen Lipase	+	-	+[c]	- (teilweise)	-	+	-	-
Expression der reifen Lipase	+	+	+	-	-	+	+	-
Rückfaltung	-	+	-	-	+	-	+	+
Ausbeute (mg l^{-1})	28	-	156	28	k. A.	15,35	152	117
Ausbeute (gereinigt) (mg l^{-1})	12,6	10-15	68	10,5	k. A.	0,44	62	59
Spez. Akt. (U mg^{-1})	10000	10000	8570	103	k. A.	7640	5100	6330
pH Opt.	8,3	8,5	8,1	k. A.	8,0	8,0	8,0	7,5
pI	k. A.	>9,0	>9,0	k. A.	k. A.	8,65	8,1 (gesch.)	7,2 (gesch.)
Temp. Opt.	40	25	30	k. A.	30-55	30	30	30
Temp. Stab.	<50[a]	<40[a]	<50	k. A.	<60[a]	42	<50	<75

1) **(Ben Salah, *et al.* 1994)** 2) **(Beer 1994, Beer, *et al.* 1998)** 3) **(Takahashi, *et al.* 1998)**
4) **(Beer 1994, Beer, *et al.* 1998, Beer, *et al.* 1996)**
5) **(Haas, *et al.* 1992)** 6) **(Joerger undHaas 1993)** 7) **(Joerger undHaas 1993)**

a abgeschätzt aus der Temperaturaktivität, die tatsächlichen Werte können deutlich darunter liegen.

b Mischung aus ProROL und Pro(28)ROL, das aus einer partiellen Prozessierung der ProROL in *S. cerevisiae* hervorging.

c Jedoch nicht die ProROL, sondern den α-Faktor aus *S. cerevisiae*.

Die pH Aktivität und Stabilität der reifen Lipasen aus *Pichia pastoris* und *E. coli* wurde unter gleichen Bedingungen untersucht und zeigten ein identisches Profil (vergleiche auch (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998, Ben Salah, *et al.* 1994)), das mit dem von Ben Salah *et al*. veröffentlichten für die ROL aus *Rhizopus oryzae* übereinstimmt (Ben Salah, *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu werden von der ProROL völlig andere Profile und pH Optima berichtet (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998). Bei allen Proteinen liegt das pH-Optimum in der Nähe des isoelektrischen Punktes. Dies wurde von Haas *et al*.so interpretiert, daß durch die Neutralisierung der Ladung an der Außenseite der Proteine die Bindung an der Interphase verbessert wird (Haas, *et al.* 1992).

Die Lipase aus *Rhizopus oryzae* exprimiert in *E. coli* ist relativ thermolabil, bei Temperaturen über ihrem Temperaturoptimum von 30 °C zeigt sie schon deutliche Denaturierungs-Erscheinungen. Dies wurde von Beer *et al.* auf ihren niedrigen Schmelzpunkt von 38 °C gegenüber 59 °C bei der ProROL zurückgeführt (Beer 1994). Die Umsetzung von Triolein mit der reifen ROL bei verschiedenen Temperaturen wurde von Ben Salah *et al*. beschrieben (Ben Salah, *et al.* 1994), so konnte bei 50 °C keine Aktivität mehr detektiert werden. Bei dieser Temperatur wurde auch die rekombinante ROL aus *E. coli* inaktiviert. Für die ProRDL wurde eine höhere Temperaturstabilität beschrieben, jedoch nur in Abwesenheit des Substrats, bei Inkubation mit Triolein konnte keine erhöhte Thermostabilität mehr festgestellt werden (Joerger und Haas 1993).

Erstaunlicherweise zeigte die reife Lipase aus *Pichia pastoris* eine erhöhte Thermostabilität gegenüber der aus *E. coli*. Ob dies auf die bessere *in vivo* Faltung in der Hefe oder die Einführung der zwei zusätzlichen Aminosäuren am N-terminalen Ende durch die Klonierung in pPICZαA zurückzuführen ist, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Der Vergleich der Substratspezifität der ROL Präparationen aus *E. coli* und *P. pastoris* ergab eine Übereinstimmung in der Kettenlängenspezifität. Für beide Enzyme wurde eine Präferenz für moderate Kettenlängen zwischen C8 und C18 festgestellt. Sehr kurze und sehr lange Fettsäureester werden hingegen kaum hydrolysiert. Eine ähnliche Kettenlängenspezifität wurde auch von Klein *et al*. und Joerger *et. al* gefunden (Joerger und Haas 1994, Klein, *et al.* 1997). In einer anderen Arbeit wurde von Shimada *et al.* die Spezifität der ROL gegenüber langkettigen teils mehrfach ungesättigten Fettsäuren untersucht. Während C18 Fettsäuren noch gut umgesetzt wurden, sank die Aktivität bei C20 Fettsäuren schon um 75 % ab (Shimada, *et al.* 1997).

Die niedrige Aktivität für Triglyceride mit längeren gesättigten Fettsäuren sind zum Teil auf die schlechtere Emulgierbarkeit der entsprechenden Substrate und damit einhergehend des Fehlens der Grenzflächenaktivierung der Lipasen zurückzuführen. Einen Hinweis darauf gibt die hohe Aktivität gegenüber Triolein (C18:1), die nur von den optimalen Substraten Tricaprylin (C8:0) und Tricaprin (C10:0) übertroffen wird.

Der Vergleich der Eigenschaften der nativen ROL bzw. RDL aus *E. coli* hat gezeigt, daß die rekombinanten Enzyme ähnliche Eigenschaften wie der Wildtyp haben (Beer 1994, Ben Salah, *et al.* 1994, Haas, *et al.* 1991, Haas, *et al.* 1992, Joerger undHaas 1993). Die reife Lipase, die in *Pichia pastoris* produziert wurde, reiht sich in diese Auflistung nahtlos ein und stellt somit eine echte Alternative bzw. Weiterentwicklung zur Expression in *E. coli* dar. Die erhöhte Thermostabilität der in *Pichia pastoris* exprimierten Lipase ist dabei ein weiterer Vorteil.

3.5 Entwicklung einer Tag-Toolbox durch Zufallsmutagenese der Metallbindungsstelle der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori*

3.5.1 Herstellung einer Bibliothek unterschiedlicher Tagsequenzen und deren Validierung

Die Herstellung von Peptidsequenzen mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide ist eine einfache und effektive Methode um eine variable Bibliothek an möglichen Metallbindungsstellen zu erhalten. Durch die Degenerierung des genetischen Codes ist jedoch die Häufung von Aminosäuren, die durch mehrere Codons codiert werden höher als solche, die nur durch ein Codon codiert werden (z. B. Prolin wird durch CCA, CCT, CCG und CCC, Methionin jedoch nur durch ATG kodiert). Bei den sequenzierten Klonen konnte davon abgesehen jedoch keine signifikante Kummulation bestimmter Sequenzen entdeckt werden.

Die Fusion an einen geeigneten Reporter erleichtert das Auffinden von Sequenzen mit der gewünschten Sequenz im *High-Throughput Screening.* Darüber hinaus kann durch die *in vivo* Herstellung im Gegensatz zur chemischen Synthese eine nahezu beliebige Menge des Peptids

hergestellt werden. So wurde für die Untersuchung von Metallbindungsstellen der ATPasen aus *Helicobacter pylori* von Volz *et al.* die chemische Synthese der Oligopeptide verwendet (Volz, *et al.* 1998). Dies war jedoch nur für eine vergleichsweise kleine Anzahl möglich. Eine andere Alternative, Peptidsequenzen in größerer Anzahl zu erhalten, wurde von Yang *et al.* beschrieben indem er verschiedene Protein-Hydrolysate zu Affinitäts-Untersuchungen an Metallen untersuchte (Yang, *et al.* 1998). Der Vorteil dieser Methode ist, daß schon im Protein vorhandene, natürliche Metallbindungsstellen gefunden werden können. Der Erfolg der Methode ist jedoch stark vom verwendeten Polypeptid abhängig. Nicht alle Proteine mit interessanten Eigenschaften stehen aber in den benötigten Mengen zur Verfügung. Außerdem werden eine ganze Reihe "nicht-natürlicher" Peptidsequenzen nicht berücksichtigt, der His_6-Tag wäre mit dieser Methode wohl nicht gefunden worden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der hohe Aufwand im Sekundär-Screening der Klone. Manchmal mögen verschiedene Peptidfragmente an die gewählte Matrix binden, diese müssen getrennt und deren Sequenz durch Proteinsequenzierung bestimmt werden. Bei der oben beschriebenen Methode der degenerierten Oligonukleotide kann die Sequenz eines Tags durch DNA-Sequenzierung bestimmt werden, eine Methode, die wesentlich schneller, einfacherer und preiswerter ist, als die Proteinsequenzierung. Ebenso ist durch die Vereinzelung der Klone die Homogenität der Peptidsequenz sichergestellt. Tabelle 2.6 zeigt, daß mit der verwendeten Technik eine hinreichend gute Variation der HeliTag-Sequenzen erreicht werden konnte. Es ist auch die statistisch erwartete Menge inaktiver Klone durch den Einbau von einem der drei Stop-Codons in den variablen Positionen zu beobachten.

3.5.2 Screening der Peptidbibliothek auf metallbindende Sequenzen und deren Eignung zur IMAC

Die völlige *de novo* Synthese eines Metallaffinitätstags mit zehn Aminosäuren erfordert theoretisch das Durchmustern von 10^{20} Klonen. Da jedoch in der Realität auch Wiederholungen gleicher Sequenzen auftreten werden, müßte ein Vielfaches dieser Anzahl untersucht werden.
Durch die Verwendung der Metallbindungsstelle der ATPase 439 aus *Helicobacter pylori* konnte der Aufwand für das *Screening* deutlich reduziert werden.
So wurde beim Durchmustern der Peptidbibliothek eine große Anzahl (über 60 % der untersuchten Klone) von Peptiden gefunden, die eine Bindung an mit Ni^{2+}-beschickter *Chelating*

Sepharose eingingen, sich aber hinsichtlich der Bindungseigenschaften bzw. des Elutionsverhalten wie gewünscht unterschieden.
Die Entwicklung des Assays ist der entscheidende Schritt zur Durchmusterung von großen Peptidbibliotheken. Er sollte sowohl möglichst einfach und schnell, als auch hochspezifisch sein - um die Anzahl falschpositiver Varianten gering zu halten - und unter Bedingungen stattfinden, die zur tatsächlichen Anwendung so weit wie möglich identisch sind.
Im vorliegenden Fall wurden diese Bedingungen durch die Verwendung von EGFP als Reporterprotein erreicht. Mit diesem war die einfache visuelle bzw. fluoreszenzspektroskopische Detektion des Reinigungsverhaltens möglich. Weiterhin wurden Membranfilterplatten mit 96 Kavitäten zur Nachbildung von kleinen IMAC Säulen verwendet, dies erlaubte das parallele robotergestützte Screening von 96 Klonen. So konnte ein wesentlich höherer Durchsatz verglichen mit den zu diesem Zweck häufig verwendeten Ni-NTA Säulen (Qiagen) erreicht werden.
Das Screening von einer vergleichsweise geringen Anzahl von Klonen (ungefähr 1000) erlaubte die Auffindung eines gegenüber dem HisTag verbesserten Tags (HeliTag M13).
Der Begriff verbesserter Metallbindungstag macht eine kurze Erläuterung der gewünschten Eigenschaften eines Tags notwendig. Ein Metallaffinitätstag ist dann gegenüber dem HisTag eine Verbesserung wenn er:

1. Selektiver bindet.
2. In einem geringerem Volumen selektiv eluiert werden kann.
3. Bei geringeren Imidazolkonzentrationen, d. h. schonender eluiert werden kann, ohne daß die Selektivität darunter leidet.
4. Höhere Ausbeuten an gereinigtem Protein ergibt.

Auch wenn der HisTag im Moment am häufigsten verwendet wird, gibt es einige Argumente, die gegen ihn sprechen. Zum Einen ist sein industrieller Einsatz durch Patente eingeschränkt, zum Anderen verändert er durch seine "unnatürliche" Aminosäuresequenz häufig die Proteineigenschaften.
Wie Tabelle 2.7 zeigt, ist der HeliTag M13 in dieser Beziehung dem HisTag in zwei Punkten überlegen, er eluiert in einem geringeren Volumen und erlaubt eine höhere Ausbeute. Allerdings ist die zur Elution benötigte Imidazol-Konzentration höher. Gegenüber dem WtHeliTag kann er mit einer geringeren Imidazolmenge, d. h. schonender eluiert werden, ohne etwas von seiner Selektivität einzubüßen. Gegenüber dem HisTag ist der HeliTag M13, wie auch der

Wildtyp, sehr stark an die Verwendung von Nickel als Metallsalz gebunden, da die Bindung an Zink zu schwach zur Verwendung in der IMAC ist. Kupfer bindet an den HeliTag M13 und den WtHeliTag stärker als an die Matrix, was zu einem Ausbluten der Säule bei der Elution kommt.
Der HeliTag M13 konnte durch die Insertion der Faktor X_a-Schnittstelle rückstandslos vom EGFP abgetrennt werden, ohne daß Veränderungen in den Charakteristika sowohl des Proteins, als auch der Eigenschaften des HeliTags M13 gefunden werden konnten. Dies ist insbesondere bei der Zulassung von pharmazeutischen Proteinen erforderlich, da es sonst beim Einsatz von diesen Fusionsproteinen z. B. zu unerwünschten Immunreaktionen kommen kann.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten HeliTag M13 konnte gezeigt werden, daß durch die Variation der Metallbindungsstelle der ATPase 439 Peptidsequenzen mit unterschiedlichen Eigenschaften erzeugt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde so ein Tag gefunden, der bessere Ausbeuten als der HisTag bietet. Durch die Variation der Screening Bedingungen ist jedoch auch das Auffinden von Tag-Sequenzen mit anderen Eigenschaften möglich, z. B. einer schwächeren Bindung, um noch schonendere Elutions-Bedingungen zu ermöglichen.

3.5.3 Klonierung des HeliTags M13 an die ROL zur IMAC

Der HeliTag M13 wurde N-terminal erfolgreich an die Lipase BTL-2 aus *Bacillus thermocatenulatus* fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Das Fusionsprotein konnte anschließend erfolgreich durch IMAC aufgereinigt werden (Heckleroth, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurden drei Konstrukte zur Fusion des HeliTags M13 an die ROL hergestellt. So wurde im Fall von pPICZαA_HeliN der HeliTag M13 an das 5´- sowie bei pPICZαA_HeliC bzw. pPICZαA_X_aHeliC an das 3´-Ende des ROL Gens fusioniert. Das Plasmid pPICZαA_X_aHeliC beinhaltete erneut die Erkennungssequenz für den Faktor X_a zur rückstandslosen Abspaltung des HeliTags.

Die Expression der Fusionsproteine ergab jedoch keine, bzw. nur wenig Lipaseaktivität im Überstand. Während im Fall der C-terminal fusionierten Tags überhaupt keine Lipaseaktivität mehr detektiert werden konnte, zeigte das Fusionsprotein mit dem N-terminal fusionierten

Tags zumindest eine im Vergleich zum "ungetaggten" Protein niedrige Aktivität von 10 U ml^{-1} (ca. 10 %) . Zur Untersuchung der Überstände mit SDS-PAGE waren die Expressionsraten allerdings zu gering. So ist es im Moment noch nicht klar, ob die entsprechenden Konstrukte nur schlecht oder gar nicht von der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert bzw. sekretiert wurden oder ob das Enzym durch die Fusion des HeliTags z. B. durch die Ausbildung falscher Schwefelbrücken, inaktiv exprimiert wurde. Dies werden jedoch weitere Untersuchungen in der Zukunft zeigen.

4 Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war die Klonierung, Expression und Reinigung der Lipase aus *Rhizopus oryzae* (ROL) in aktiver Form.

Die Lipase aus *Rhizopus oryzae* konnte in der Vergangenheit in *E. coli* erfolgreich in Form inaktiver Einschlußverbindungen exprimiert werden. Um daraus die aktive Lipase zu erhalten, mußte diese durch eine teure und aufwendige Rückfaltungsprozedur renaturiert werden. Dadurch ist dieses Expressionssystem trotz guter Ausbeuten nur für Kultivierungen in kleinem Maßstab geeignet. Um dieses Problem zu umgehen, sollte das Expressionssystem gewechselt werden.

Ein häufig verwendeter Organismus zur Expression heterologer Proteine ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. In der vorliegende Arbeit wurde die für die ROL kodierende Gensequenz zusammen mit dem α-Faktor zur Proteinsekretion in das Plasmid pYes unter Kontrolle des Galaktosidasepromotors pGal kloniert. Die Transformation und Kultivierung der Hefe wurde erfolgreich durchgeführt, jedoch blieben die Ausbeuten an aktivem Protein weit hinter den Erwartungen zurück. Da die Hefe *Pichia pastoris* dafür bekannt ist, heterologe Proteine mit höheren Ausbeuten zu exprimieren als *Saccharomyces cerevisiae*, wurde die ROL in die Vektoren pPICZαA, sowie pGAPZαA kloniert. Beide Vektoren sind *Pichia pastoris*/*E. coli*-Schaukelvektoren; einer unter Kontrolle des induzierbaren pAOX1 Promotors, der andere unter Kontrolle des konstitutiven pGAP Promotors der Hefe *Pichia pastoris*. Die Plasmide konnten erfolgreich in den *Pichia* Stamm GS115 transformiert werden. Die Anzahl der Transformanten war jedoch außerordentlich gering (in der Regel <10 Klone pro Transformation). Daraufhin wurden verschiedene Transformationsprotokolle untersucht und schließlich eine geeignete Variation selbst entwickelt. Basierend auf der Elektroporationsmethode von Invitrogen konnten mit dieser Methode bis zu 100-200 positive Klone pro Transformation erhalten werden.

Bei allen Kolonien konnte auch Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Die Expressionraten bei Kultivierungsversuchen in Schüttelkolben zeigten jedoch erstaunliche Unterschiede. Es wurden jeweils die Klone selektiert, die pro gemessener OD_{600} die größte Aktivität aufwiesen und diese wurden zur Kultivierung verwendet.

Die Expression unter Kontrolle des pAOX Promotors war ungefähr doppelt so hoch wie die unter Kontrolle des pGAP Promotors, weshalb er für weitere Arbeiten den Promotor der Wahl darstellte.

Der für die ersten Untersuchungen verwendete *Pichia*-Stamm GS115 enthält eine Deletion des His 4 Genes. Bei der Kultivierung in synthetischem Medium stört diese Deletion jedoch, da sie die Supplementierung von Histidin erfordert. Aus diesem Grund wurde ROL unter Kontrolle des AOX Promotors auch im *Pichia* Wildtyp-Stamm X-33 exprimiert.

Außerdem wurden zwei rationale Mutanten realisiert (L258W u. L258Y), von denen auf Grund von *Molecular Modelling* Untersuchungen eine gegenüber dem Wildtyp geänderte Stereopräferenz bei der Spaltung von Triglycerin Analoga vermutet wird.

Die reife ROL konnte erfolgreich in komplexen Medium im Schüttelkolben kultiviert und aktiv in das Medium sekretiert werden. Durch Fermentation konnte die Lipaseaktivität im Überstand von 110 U ml^{-1} bis auf 500 U ml^{-1} gesteigert werden, ein Wert, der mit der Produktion in *E. coli* bei gleichem Volumen vergleichbar ist. Die Kultivierung in komplexem Vollmedium ist jedoch teuer, weshalb die Kultivierung der ROL in synthetischem Medium untersucht wurde. Durch die Variation und Optimierung der Fütterungsstrategie und Kontrolle des Methanol-Gehalts im Fermenter konnte die Ausbeute auf 1300 U ml^{-1} gesteigert werden. Die Lipase aus den verschiedenen Kultivierungen in komplexem Medium konnte durch einen Konzentrierungs- und einen Chromatographieschritt bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der in *Pichia pastoris* exprimierte ROL ergab, daß diese der in *E. coli* exprimierten vergleichbar ist, allerdings besitzt die in *P. pastoris* exprimierte eine erhöhte Thermostabilität.

Die Metall-Affinitätschromatographie wird in zunehmendem Maße als Einschrittreinigung verwendet. Da der am häufigsten verwendete HisTag jedoch einige Nachteile besitzt, wurde ein neuer Metall-Affinitätstags, ausgehend von der zehn Aminosäuren großen Nickelbindungsstelle einer ATPase aus *Helicobacter pylori,* entwickelt. In dieser Metallbindungsstelle wurden vier Aminosäuren fixiert, die für die Bindung essentiell sind und sechs Aminosäuren variiert. Unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden wurde eine, an EGFP als Reporter fusionierte Peptidbibliothek erstellt, die mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Screenings mit Membran-Filterplatten durchmustert wurden. Damit konnte schon nach dem Screenen von nur ca. 1000 Klonen ein Peptid gefunden werden, das gegenüber dem HisTag verbesserte Eigenschaften aufwies.

5 Material & Methoden

5.1 Verwendete Geräte

Tabelle 5.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte

Firma	Geräte
Amicon	Ultrafiltrationssystem Amicon 8050
Applied Biosystems	373 A DNA Sequenzer, 491 Proteinsequenzer
Beckmann	Biomek2000
BioRad	Gene Pulser® und Pulse Controller für Elektroporation, Geltrockner 583, DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, Mini-Sub™-Cell GT, Power Pac 300, Transblot SD, Power supply 220/2.0
BioRobotics	BioPick
Branson	Sonifier W-250
BMG	Fluorimeter und Absorptionsspektrometer: Fluostar,
Braun	Fermenter Biostat E (5 l)
Certoclav	Autoklav IP 44
Du Pont Instruments	Sorvall RC5B Refrigated Superspeed Zentrifuge
Eppendorf	Tischzentrifuge 5415 C, Kühlzentrifuge 5403, 5417 R, Thermomixer, PCR-Maschine Mastercycler Gradient
Filtron	Ultrafiltrationskammer
Finn-Aqua	Gefriertrockner Lyovac GT 2
Getringe	Autoklav Pacs 2000
Hettich	Zentrifuge Universal 30 F
Infors	Wasserbäder, Horizontal-Schüttelinkubator, Fermenter Labfors (2 l, 5 l)
Janke & Kunkel	Vortex, Rührer, Ultra-Turrax T25
Jouan	Kühlzentrifuge KR 22i
Maihak	Unor 611 Gasanalyser
Metrohm	Dosimat 665, Rührer 649, pH-meter 620, Impulsomat 614
Millipore	Millipore Filtron 0,025 µm
MWG-Biotech	Thermocycler Hybaid Omnigene, Video-Dokumentationssystem
Perkin Elmer	DNA Thermal Cycler
Pharmacia	Photometer Ultrospec 3000, Biochrom 4060, FPLC, Biopilot
Shimadzu	UV/VIS-Spektrometer UV-1202
Stratagene	Robocycler® Gradient 40
WTW	Digitales pH-Meter pH525
Zeiss	Mikroskop Axiolab E, Achroplan 10x/0.25, 40x/0.65, 100x/1.0

5.2 Chemikalien

Tabelle 5.2: Verzeichnis der Hersteller der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Applied Biosystems, Weiterstadt	Chemikalien für DNA und Proteinsequenzierung
ARK, Darmstadt	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung
Bio-Rad, München	Standards für SDS-PAGE (LMW), PVDF Membran
Boehringer Mannheim	Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP), Taq Polymerase
Clontech, Heidelberg	Plasmide, z. B. pEGFP
Difco, Augsburg	Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Yeast Nitrogen Base, Hefeextrakt, Fleischextrakt
Fluka, Deisenhofen	Chemikalien
Aldrich, Deisenhofen	Chemikalien
Interactiva, Ulm	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung
MWG, Ebersberg	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP), Taq Polymerase, Standard für DNA-Gele, Plasmide z. B. pUC18
Merck, Darmstadt	Chemikalien, Lösungsmittel
Pharmacia, Freiburg	SP-Sepharose, Streamline SP-Sepharose, Chelating Sepharose Fast Flow, Protein Gele 8-25, dNTP´s
Pierce, Baoud-Beijerland, NL	BCA Kit zur Proteinbestimmung
Qiagen, Hilden	Plasmid Midi Kit, Prepspin Plasmid Kit, Qiaquick Gelextraction Kit, Ni-NTA-Superflow,
Riedl-de Haen	Lösungsmittel
Roth, Karlsruhe	Rotiphorese NF-Acrylamid, Roti-Phenol-Chloroform, NF-Harnstoff, Agarose
Sigma, Deisenhofen	Chemikalien
Stratagene, Heidelberg	Quik Change™ Kit zur positionsgerichteten Mutagenese
Invitrogen	Easy Comp Transformation Kit
Gibco	1 kb Ladder

5.3 Verwendete Plasmide

Tabelle 5.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Größe	Charakteristik	Referenz/Lieferant
PCYTEXP1	4985	Amp^r, λ-Promotor	(Belev, *et al.* 1991)
PUC18	2686	Amp^r, lacZ-Promotor	MBI Fermentas
pPICZαA	3330	$Zeocin^r$, Schaukelvektor für *E. coli* und *P. pastoris*, AOX-Promotor, α-Faktor	Invitrogen
pGAPZαA	2884	$Zeocin^r$, Schaukelvektor für *E. coli* und *P. pastoris*, GAP-Promotor, α-Faktor	Invitrogen
pEGFP	3355	Amp^r, lacZ-Promotor, EGFP Gen	Clonetech

5.4 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 5.4 : In dieser Arbeit verwendete Primer

Name	Sequenz (5´ → 3´)	Verwendung
GFP_Who_1	GCAATACCATGGGGCATXXXCATXXXXXXXXXTGTXXXXXXTGTGTGAGCAAGGGCGAG	Fusion von WOBBLE-Tags an EGFP
GFP_Who_2	CAGTTGGAATTCTAGAG	Fusion von WOBBLE-Tags an EGFP
GFP_His_1	GCAATACCATGGGGCATCATCATCATCATCATGTGAGCAAGGGCGAG	Fusion des HIS-Tags an EGFP
GFP_Wt_1	GCAATACCATGGGGCATATTCATAATCTTGATTGTCCTGATTGTGTGAGCAAGGGCGAG	Fusion des WT-Tags aus *Helicobacter pylori* an EGFP
GFP_Xa_M13_1	GCAATACCATGGGGCATAATCATCGTTATGGTTGTGGTTGTTGTATAGAAGGACGTGTGAGCAAGGGC	Fusion des M13-Tags und der Protease Schnittstelle Xa an EGFP
ROL_Eco1	CGACCGTAGCGCAGGAATTCTCTGATGGTGGTAAGG	ROL aus pT1-OmpAROL
ROL_Not2	CTTAGGATCCACGTGCGGCCGCTTATTACAAACAAGC	ROL aus pT1-OmpAROL
ROL_C_Tag2	CTGGCGGCCGCTTATTAATGATTATGACGATAACCACAACCACAACACAAACAGCTTCCTTC	Fusion des HeliTag M13 an das C-terminale Ende der ROL
ROL_C_Xa_Tag2	CTGGCGGCCGCTTAATGATTATGACGATAACCACAACCACAACATATTTCTCCACGCAAACAGCTTCC	Fusion des HeliTag M13 mit Xa-Protease-Schnittstelle an das C-terminale Ende der ROL
ROL_N_Tag1	GCTGAAGCTGAATTCCATAATCATCGTTATGGTTGTGGTTGTTGTTCTGATGGTGGTAAGG	Fusion des HeliTag M13 an das N-terminale Ende der ROL
ROL_Seq1	GACAGGCTTGTAGTCGG	Sequenzierprimer für ROL
ROL_Seq2	GGTTCATGCTGGTTTCC	Sequenzierprimer für ROL
ROL_Seq3	CTCCTTGATCACTTGAG	Sequenzierprimer für ROL
pYes_alpha_bam1	CTAATTCGAAACGGGATCCATGAGATTTCCTTC	Klonierung des α-ROL-Gens in pYes
EGFP_Seq1	CTGCGCCGTCCAGCTCGACCAG	Sequenzierung für Tags fusioniert an EGFP

5.5 Arbeiten mit Mikroorganismen

5.5.1 Verwendete Mikroorganismen

Tabelle 5.5 Alle in der Arbeit verwendeten Mikroorganismen

Spezies	Stamm	Charakteristik	Referenz/Anbieter
Escherichia coli	JM105	supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ(lac-proAB) F´[traD36 proAb^{+}lac^{q} lacZΔM15]	Pharmacia
Escherichia coli	DH5α	supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1	DSMZ
Epicurian coli	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´proAB lacl^{q}ZΔM15 Tn 10 (Tet^{r})]	Stratagene
Pichia pastoris	GS115	*his4*	Invitogen
Pichia pastoris	X-33	Wt	Invitrogen
Saccharomyces cerevisiae	INVSc2	MATa *his3*Δ1 *leu2* *trp*1-289 *ura*3-52	Invitrogen

5.5.2 Kultivierung, Lagerung und Transformation der Mikroorganismen und Proteinexpression in den Mikroorganismen

Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 120 °C und 2 bar Druck autoklaviert und nach dem Abkühlen mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

5.5.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde, soweit nicht anders vermerkt, in Luria-Bertani Medium (LB) (Luria, *et al.* 1960) kultiviert:

LB	Trypton (10 g l^{-1}), Hefeextrakt (5 g l^{-1}), NaCl (5 g l^{-1})

5.5.2.2 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Um chemisch kompetente *Escherichia coli* herzustellen, wurde eine 50 ml LB-Kultur im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtkultur angeimpft und solange bei 37 °C, 250 rpm inkubiert, bis die OD_{600} einen Wert zwischen 0,5 – 0,7 erreicht hatte. Nach Zentrifugation (4 °C, 11000xg, 10 Min.) wurde das Pellet in 2 ml TSS (PEG 6000 (10 %(w/v)), DMSO (5 %(v/v)), $MgCl_2$ (50 mM) aufgefüllt mit LB Medium) resuspendiert und in 200 µl Portionen aliquotiert. Die zu transformierende DNA wurde zugegeben und mindestens 20 Minuten mit den Zellen auf Eis inkubiert. Um die DNA zu transformieren, wurden die Zellen 45 sek. auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurden 800 µl LB Medium zugegeben. Die Zellen wurden 60 Min. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert und kurz bei 2700xg und 4 °C zentrifugiert. Etwa 700 µl des Mediums wurden entfernt, die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert, auf LB-Agar mit einem geeigneten Selektionsmarker ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.5.2.3 Expression von ROL in *Escherichia coli*

Die Expression der ROL erfolgte nach Beer *et al*. (Beer 1994, Beer, *et al.* 1998) und soll deshalb im Folgenden nur kurz beschrieben werden. Im Gegensatz zu Beer *et al*. wurde in diesem Fall der Stamm DH5α transformiert mit pTOmpAROL zur Expression verwendet. Zum Animpfen der zwei 500 ml LB-Kulturen mit Ampicillin als selektivem Marker (100 µg ml^{-1}) wurden jeweils 2,5 ml einer 5 ml Übernachtkultur verwendet (37 °C). Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen dieser Zelldichte, wurde der temperatursensitive λ-Promotor durch eine Temperaturerhöhung auf 42 °C induziert und die Produktion der Lipase als inaktive Einschlußverbindungen (*Inclusion Bodies)* gestartet. Nach 4 h bei dieser Temperatur wurden die Zellen geerntet und durch

Zentrifugation (10 Min, 5000 U min^{-1} 4 °C) vom Medium abgetrennt. Die Zellen wurden in 40 ml Puffer (EDTA (100 mM) gelöst in 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0) resupendiert und durch 2 mal 2 Minuten Behandlung mit Ultraschall lysiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (14000 U min^{-1}, 20 Min., 4 °C) und das enstandene Pellet in 40 ml Puffer (30 µg ml^{-1} DNase, 100 mM NaCL und 1 mM EDTA gelöst in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0)) resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Bedingungen siehe oben) wurde das Pellet in 40 ml Puffer (0,5 % (w/v) Triton X-100, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA gelöst in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0)) resuspendiert und anschließend wieder unter den oben genannte Bedingungen zentrifugiert. Nach erneuter Resupension im Triton-Puffer und Zentrifugation sind die *Inclusion Bodies* weitestgehend von anderen Proteinen befreit.
Die *Inclusion Bodies* werden in 20 ml Denaturierungslösung (7 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst in Tris-Puffer (pH 8,5)) resuspendiert und nach Zugabe von DTT (Endkonzentration 30 mM) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der nachfolgenden Zentrifugation (15000 U min^{-1}, 30 Min., 4 °C) wurde in 2 l eisgekühltem Renaturierungspuffer (10 % (w/v) Glycerin und je 1 mM GSH und GSSG gelöst in 20 mM $CaCl_2$-Lösung) unter schwachem Rühren verdünnt. Nach der Inkubation für 36 h bei 10 °C wurde die Lösung in Dialyseschläuche (MWCO:6-8000, Spectra/Por Membran, Roth) gefüllt und gegen 10 mM $CaCl_2$ ca. 16 h bei ein- bis zweimaligen Pufferwechsel dialysiert. Die weitere Aufreinigung der renaturierten ROL erfolgte durch Säulenchromatographie wie in Kapitel 5.8.1 beschrieben.

5.5.2.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Kultivierung der Hefe wurde YPD Medium verwendet:

YPD	Pepton (20 g l^{-1}), Hefeextrakt (10 g l^{-1}), Glukose (20 g l^{-1})

Synthetisches Medium zur Expression von positiven Transformanten:

Synth. Medium	Galaktose oder Glukose (20 g l^{-1}), *Yeast Nitrogen Base* (6,7 g l^{-1}), AS-Mix (50 mg l^{-1}), Phosphatpuffer (100 mM, pH 6.0)

Eine Einzelkolonie wurde in 15 ml synthetischem Medium mit Glukose über Nacht kultiviert (30 °C, 225 rpm). Nach der Zentrifugation der Kultur wurde das Zellpellet in 15 ml syntheti-

schem Medium mit Galaktose resuspendiert. Die OD_{600} der Suspension wurde bestimmt und eine 50 ml Kultur mit synthetischem Medium mit Galaktose so angeimpft, daß eine Start OD_{600} von 0,4 erreicht wurde. Nach 24 h wurde nochmals Galaktose (10 g l^{-1}) zugegeben. Nach 48 h wurde die Kultur zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der Lipaseaktivität konzentriert.

Selektion von Transformanten durch Uracil Auxotrophie:

Selektions Medium	Glukose (20 g l^{-1}), Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (1,7 g l^{-1}), AS-Mix (2 g l^{-1}), Ammoniumsulfat (5 g l^{-1})
AS-Mix	Adenin (2,0 g) L-Alanin (2,0 g), L-Arginin (2,0 g), L-Asparagin (2,0 g), L-Aspartat (2,0 g), L-Cystein (2,0 g), L-Glutamin (2,0 g), L-Glutamat (2,0 g), L-Glycin (2,0 g), L-Histidin (2,0 g), L-Lysin (2, 0 g), L-Leucin (2,0 g), myo-Inositol (2,0 g), L-Isoleucin (2,0 g), L-Methionin (2,0 g), L-Phenylalanin (2,0 g) L-Prolin (2,0 g), L-Serin (2,0 g), L-Threonin (2,0 g), L-Tryptophan (2,0 g), L-Valin (2,0 g) PABA (0,2 g)

Zur Herstellung von Platten wurden 14 g l^{-1} Agar zugegeben.

5.5.2.5 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Stamm INVSc2 (ura^-, his^-; Invitrogen) wurde zur Transformation mit der Lithiumacetat-Methode nach Gietz *et al*. verwendet (Gietz, *et al.* 1995):
Bei dieser wurde die Hefe in 50 ml YEPD Medium kultiviert, bis eine OD_{600} von 1- 2 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 3600 rpm zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit demselben Volumen Wasser und einmal mit Li-Acetat-Lösung (0,1 M, pH 7,5) gelöst in TE (Tris (10 mM), EDTA (1 mM); pH 7,5) gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in Li-Acetat-Lösung (250 µl) resuspendiert und 50 µl dieser Lösung wurden mit 1 µg DNA, 20-40 µg Lachssperma DNA und 300 µl PEG 3350-Lösung (50 % (w/v) in Li-Acetat-Lösung) vermischt. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und dann für 20 Minuten einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach der Zentrifugation der Zellen zur Konzentrierung und Resuspendierung mit der verbliebenen Lösung wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert (siehe 5.5.2.4)

5.5.2.6 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Zur Kultivierung und Lagerung der Hefe wurde YPD Medium verwendet:

YPD	Pepton (20 g l^{-1}), Hefeextrakt (10 g l^{-1}), Glukose (20 g l^{-1})

Pepton und Hefeextrakt wurden in 900 ml dH_2O suspendiert und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 100 ml der Glukose-Lösung (200 g l^{-1}) zugegeben.

Zur Expression der Lipase in komplexem Medium wurde BMGY bzw. BMMY verwendet:

BMGY	Pepton (20 g l^{-1}), Hefeextrakt (10 g l^{-1}), Phosphatpuffer (100 mM, pH 6,0), Biotin 4 x 10^{-5} %, Glycerin (1 %)
BMMY	Pepton (20 g l^{-1}), Hefeextrakt (10 g l^{-1}), Phosphatpuffer (100 mM, pH 6,0), Biotin 4 x 10^{-5} %, Methanol (0,5%)

Zur Kultivierung im Fermenter und zur Bestimmung des Phänotyps wurden folgende synthetische Medien verwendet:

Basal-Salz	H_3PO_4 (26,7 ml (85 %)), $CaSO_4$ (0,93 g), K_2SO_4 (18,2 g), $MgSO_4$ x 7 H_2O (14,9), KOH (4,13 g), Glycerin 40 g + PTM1 (12 ml)
FM 21	KH_2PO_4 (5 g), $(NH_4)_2SO_4$ (6 g), $MgSO_4$ x 7 H_2O (2 g), $CaSO_4$ x 2 H_2O (3 g) + ÜM1 (12 ml)
PTM1	$CuSO_4$ x 5 H_2O (6,0 g), NaI (0,08 g), $MnSO_4$ x H_2O (3,0 g), Na_2MoO_4 x 2 H_2O (0,2 g), H_3BO_3 (0,02 g), $CoCl_2$ (0,5 g), $ZnCl_2$ (20.0 g), $FeSO_4$ x 7 H_2O (65,0 g), Biotin (0,2 g), H_2SO_4 (conc., 5 ml)
ÜM1	$CuSO_4$ x 5 H_2O (6,0 g), KI (0,8 g), $MnSO_4$ x H_2O (3 g), Na_2MoO_4 x 2 H_2O (0,2 g), H_3BO_3 (0,03 g), $CoCl_2$ (0,5 g), $ZnCl_2$ (20.0 g), $FeSO_4$ x 7 H_2O (65,0 g), Biotin (2,5 x 10^{-5} % (w/v)), H_2SO_4 (0,5 % (v/v)), Histidin (1 x 10^{-4} % (w/v))

5.5.2.7 Bestimmung des Phänotyps von mit pPICZαA_ROL transformierten *Pichia pastoris*

Jeweils zwei identische 200 ml Kolben befüllt mit 50 ml Basal Salz bzw. 50 ml Basal Salz Medium ohne Glycerin jedoch mit 0,5 % (v/v) Methanol wurden mit 500 µl einer Übernacht-kultur der verschiedenen Klone angeimpft und 24 h bei 30 °C kultiviert. Die OD_{600} der Kulturen wurde bestimmt und miteinander verglichen. Unterschied sich die OD_{600} der Kulturen um mehr als 50 % wurden sie als Mut^s eingestuft.

5.5.2.8 Detektion von Methanol in synthetischem Medium durch GC

Die Methanolkonzentration wurde mit einem Gaschromatographen 5890 von Hewlett Packard mit automatischem Injektor 7376A von Hewlett Packard durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor und das GC wurde durch die Software Millenium 32 gesteuert.
Als stationäre Phase diente eine TR-FFAP Säule (25 m X 0,53 mm) mit Helium als mobiler Phase (9,0 ml min^{-1}). Die Proben aus dem Fermenter wurden zentrifugiert und durch ein 0,45 µm Filter filtriert und ohne weitere Probenvorbereitung in das GC injiziert (1 µl; Split 1:5,5).
Die gesamte Analyse mit Ausheizphase dauerte 15 Minuten mit folgendem Programm:

- Injektor-Temperatur: 200 °C
- Detektor-Temperatur: 280 °C
- Laufbedingungen:
  Start: 40 °C für 4 Min.
  Gradient 1: 26,7 °C min^{-1} bis 200 °C (für 7 Min)

5.5.2.9 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation nach Invitrogen

5 ml einer *P. pastoris* Übernacht-Kultur wurden in 50 ml YPD-Medium über Nacht bei 30 °C kultiviert. Aus dieser wurde eine 500 ml Kultur in einem 2000 ml Kolben mit 500 µl ange-impft. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 1,3-1,5

geerntet und bei 1500 x g 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in der selben Menge eisgekühltem Wasser resuspendiert, zentrifugiert (1500 x g), in 250 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert, in 20 ml eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert, nochmals zentrifugiert und zum Schluß in 1 ml eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) aufgenommen. Die kompetenten Zellen (80 µl) wurden mit 5-10 µg der linearisierten DNA, gelöst in 5-10 µl dH_2O, gemischt und in eine auf Eis stehende Elektroporationsküvette überführt. Im Folgenden wurde der Transformationsansatz in der Küvette 5 Min. auf Eis inkubiert und anschließend in einem Elektroporator (Bio-Rad GenePulser) transformiert (Spannung: 1500 V, Kapazität: 25 µF, Widerstand 200 Ω). Sofort nach dem Puls wurde 1 ml eiskaltes Sorbitol (1 M) in die Küvette gefüllt, der Transformationsansatz in ein steriles Plastikgefäß überführt und ohne Schütteln inkubiert (1 h, 30 °C). Die Zellen wurden auf YPDS-Platten (YPD + 1 M Sorbitol) mit Zeocin (100 µg ml^{-1}) ausplattiert und 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

5.5.2.10 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation nach einer vereinfachten Variante

YPD Medium (200 ml in einem 2000 ml Kolben) wurde mit zwei Impfösen *Pichia pastoris* direkt von einer YPD-Platte angeimpft und über Nacht inkubiert. Nach der Zentrifugation (1500 x g, 10 Min, 4 °C) wurde das Pellet zweimal in 200 ml dH_2O und einmal in 120 ml Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1500 x g, 4 °C). Daraufhin wurde das Pellet, abhängig von der OD_{600} der Ausgangskultur in Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert (1 ml Sorbitol-Lösung je 1,3 OD_{600}-Einheiten). Anschließend wurde wie in Kapitel 5.5.2.9 beschrieben vorgegangen.

5.5.2.11 Transformation von *Pichia pastoris* mit dem Easy Comp Kit

YPD Medium (10 ml) wurde mit einer Einzelkolonie *Pichia pastoris* angeimpft und über Nacht bei 30 °C kultiviert. Die Übernachtkultur wurde auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt, 10 ml entnommen und bei 30 °C so lange inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 0,6-1,0 erreicht hatte. Im Anschluß an die Zentrifugation (500 x g, 5 Min., RT) wurde das Pellet in 10 ml der Lösung I des Kits (Sorbitol, Ethylenglykol und DMSO, Konzentrationen und pH nicht bekannt) resuspendiert, erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Min., RT) und in 1 ml Lösung I resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden in 50 µl Portionen aliquotiert und entweder

zur Transformation verwendet oder langsam bei –80 °C eingefroren. Zur Transformation wurden ca. 3 µg geschnittener DNA in 5 µl dH_2O gelöst verwendet. Darauf folgte die Mischung von 1 ml Lösung II des Kits (PEG, Konzentration nicht bekannt) mit dem Transformationsansatz. Im Verlauf der 1 stündigen Inkubationszeit (30 °C, 225 rpm), wurde die Zellsuspension alle 15 Minuten vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur auf 42 °C erhöht und 10 Minuten beibehalten. Nach Zugabe von 2 ml YPD Medium und einer weiteren Stunde Inkubation (30 °C, 225 rpm) wurde der Transformations-Ansatz 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Lösung III (Salz-Lösung, Zusammensetzung nicht bekannt) resuspendiert, zentrifugiert (3000 x g, RT, 5 Min) und in 100 µl Lösung III resuspendiert bevor die transformierten Zellen zur Selektion auf YPDS (YPD + 1M Sorbitol) Platten mit Zeocin (100 µg ml^{-1}) ausplattiert wurden.

5.5.2.12 Transformation von *Pichia pastoris* mit der LiCl Methode

Pichia pastoris wurde in einer 50 ml YPD-Kultur bis zu einer OD_{600} von 1,0 kultiviert und zentrifugiert (1500 x g, 10 Min, RT). Das Zellpellet wurde in 25 ml dH_2O resuspendiert und erneut zentrifugiert (1500 x g, 10 Min, RT). Danach wurden die Zellen in 1 ml LiCl (100 mM) resuspendiert, nochmals zentrifugiert (11100 x g, RT, 15 s) und die LiCl-Lösung entfernt. Schließlich wurden die Zellen in 400 µl LiCl-Lösung resuspendiert, in 50 µl Portionen aliquotiert und nochmals zentrifugiert (11100 x g, RT, 15 s). Zu jedem Ansatz wurden 240 µl PEG-Lösung (50 % (w/v) PEG-3350), 36 µl LiCl (1 M), 25 µl gekochte Lachs Sperma DNA (2 mg ml^{-1}) und 5-10 µg DNA, gelöst in 50 µl dH_2O zugegeben, bevor das Gemisch bis zur völligen Suspendierung der Zellen durchmischt und 30 Minuten bei 30 °C inkubiert wurde. Nachdem der Transformationsansatz 25 Minuten bei 42 °C inkubiert und bei 2700 x g zentrifugiert wurde, wurde der Überstand entfernt, das verbleibende Zellpellet in 1 ml YPD Medium resuspendiert, 1 h bei 30 °C inkubiert und auf YPDS-Platten (YPD + 1 M Sorbitol) mit Zeocin (100 µg ml^{-1}) ausplattiert.

Minimalagar zum Nachweis zur Lipaseexpression in *Pichia pastoris*

Die auf YPDS Agar gebildeten Kolonien wurden auf einen Minimalagar (Tabelle 5.6) mit Tributyrin überführt. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurde in den Deckel der Agarschale 1-2

Tropfen Methanol gegeben, um die ROL Produktion zu induzieren. Die Kolonien mit den größten gebildeten Halos wurden selektiert und kultiviert.

Tabelle 5.6: Zusammensetzung des Minimalagars

I*	2.5 ml Tributyrin, 4 g Agar, 217 ml dH_2O
II	500 µl Biotinlösung (0,02 %(w/v)), 25 ml YNB-Lösung (13,4 % (w/v)) 250 µl Zeocin (100 mg ml^{-1}), 5 ml Glukose (20 % (w/v) separat autoklaviert)

* I wurde autoklaviert, die sterilen (autoklaviert oder sterilfiltriert) Komponenten in II wurden nach dem Abkühlen von I auf ca. 50 °C zugegeben.

5.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.6.1 Isolierung von DNA aus *E. coli*

5.6.1.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly (Birnboim und Doly 1979)

Eine transformierte *E. coli* Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C in 2,0 ml LB Medium mit einem geeigneten Antibiotikum als Selektionsmarker kultiviert und zentrifugiert (4 °C, 14000 U min^{-1}, Eppendorf 5417R). Das Zellpellet wurde in 200 µl Lösung I (Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), EDTA (10 mM) , RNAse I (400 µg ml^{-1}), 4 °C) resuspendiert und mit 200 µl Lösung II (NaOH (0,2 M), SDS (1 %), RT) vorsichtig durch Schütteln vermischt. Nach 5 Minuten wurde 200 µl Lösung III (NaAc (3 M), pH 5,3) zugegeben, um die in der Zelle enthaltenen Proteine und Zelltrümmer zu fällen. Im Anschluß wurde die Suspension 5 Minuten auf Eis inkubiert, 10 Minuten bei 14000 U min^{-1} (Eppendorf 5417R) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 420 µl Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Zentrifugation (14000 U min^{-1}, Eppendorf 5417R) wurde die Flüssigkeit dekantiert und die DNA im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 15-25 µl dH_2O resuspendiert.

5.6.1.2 Isolierung von DNA mit Anionentauscher-Säulen (Qia Spin-Prep)

Um eine höhere DNA Qualität z. B. für die Sequenzierung zu erhalten, wurde das Qiagen-Kit "Prepspin Plasmid Isolierung" analog der Empfehlung von Qiagen verwendet. In diesem wird die DNA ebenfalls nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Nach der Fällung der Proteine und Zelltrümmer wird die Plasmid-DNA durch eine Säulenchromatographie an Anionentauscher Säulen von in der Lösung verbliebener genomischer DNA und RNA abgetrennt und zum Schluß von der Säule eluiert.

5.6.2 Ethanol-Präzipitation von Plasmid DNA

Die DNA enthaltende Lösung wurde mit 1/10 des Volumens Na-Acetat Lösung (3 M, pH 5,3) gemischt und 3 Volumen Ethanol (100 %, -20 °C) zugegeben. Die Präzipitation erfolgte 30 Minuten auf Eis. Nach Zentrifugation (14000 U min^{-1}, Eppendorf 5417R, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und das verbliebene Pellet mit Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen. Nach dem Abgießen der Waschlösung wurde die DNA im Vakuum getrocknet und in dH_2O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

5.6.3 Elektrophoretische Trennung von DNA und Fragmentisolierung

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte analog Sambrook 1989 (Sambroock, *et al.* 1989). Es wurden 1 % Agarosegele in TAE-Puffer (Tris-HCl (40 mM), Essigsäure (20 mM), EDTA (2mM) pH 8,3) verwendet. Dieser diente auch als Laufpuffer. Das Gel wurde in einen, mit einem Kamm versehenen, horizontalen Gelträger gegossen. Der Kamm wird nach dem Auspolymerisieren der Agarose aus dem Gel gezogen und die DNA-Lösung mit einem Auftragungspuffer (Bromphenolblau (0,1 % (w/v), Glycerin 50 % (v/v) EDTA (0,5 M, pH 8,0)) vermischt in die entstehenden Probentaschen gefüllt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V wandert die DNA durch das Gel. Die DNA wurde mit der Hilfe von Ethidiumbromid gefärbt, das sich in die Helix interkaliert und im UV-Durchlicht eines Transilluminators bei 312 nm sichtbar gemacht und photographiert werden konnte. Größen und Konzentrationsbestimmung erfolgten durch Vergleich mit einem kommerziellen Standard (Fa. Gibco).

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem "QIAquick Gel Extraktion Kit" (Qiagen) durchgeführt. In diesem wird das DNA enthaltende Stück des Agarosegels gelöst und auf einer Silikagel enthaltenden Säule immobilisiert. Nach verschiedenen Waschschritten wurde die DNA mit 50 µl H_2O eluiert.

5.6.4 *In-vitro* Manipulation an DNA: Restriktionsverdau, Ligation, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, Klenow-Behandlung und Phenolisierung

Restriktionsverdaue und Ligationen wurden nach den Angaben der Hersteller der Enzyme durchgeführt. Um bei der Ligation von nur mit einem Enzym geschnittener Plasmid DNA deren Selbstligation zu verhindern, wurden die 5´-ständigen Phosphatreste durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. Um 5´-Überhänge z. B. nach dem Restriktionsverdau aufzufüllen, um mit glatten Enden zu ligieren, wurde das Klenow-Fragment verwendet. Um geschnittene Fragmente und verwendete Enzyme von der DNA abzutrennen, wurden die Inkubationsansätze in der Regel auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschte DNA daraus extrahiert, in Einzelfällen wurde der Ansatz nur phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert.

5.6.5 Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Die PCR ermöglicht es, beliebige DNA Fragmente enzymatisch *in vitro* zu amplifizieren. Neben dem Enzym, einer DNA-Polymerase, sind dabei die Zugabe der Desoxyribonukleotide (dNTP´s), sowie zwei kurze, synthetisch hergestellte DNA-Moleküle (Primer) nötig.
Je einer dieser Primer ist komplementär zu einem der beiden Enden des gewünschten Fragments beider DNA-Stränge.

Die Vervielfältigung der DNA wird durch eine Dreischrittsequenz erreicht:

- Denaturierungsschritt: Die zu amplifizierende DNA wird bei einer Temperatur >92 °C in ihre Einzelstränge zerlegt.
- Primer-Anlagerung (*Annealing*): Die Primer lagern sich sequenzspezifisch bei einer Temperatur von 37-72 °C an die Zielregionen der beiden DNA Einzelstränge an. An dem entstehenden Stück doppelsträngiger DNA beginnt die Polymerase im nächsten Schritt mit der Synthese.
- Synthese (Extension): Bei 72 °C verlängert die Polymerase den zweiten DNA Strang in 5´-3´-Richtung.

Tabelle 5.7: Zusammensetzung einer typischen PCR Reaktion

Komponente	Volumen
10 x Reaktionspuffer (KCl (100 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (100 mM), Tris-HCl (200 mM, pH 8,8), $MgSO_4$ (20 mM), Triton X-100 (1% (w/v))	10 µl
dNTP´s (10 µM einer 10 mM Mischung)	8 µl
DNA-Matrize	x µl (ca. 0,1 µg)
1. PCR Primer	1 µl (100 pmol)
2. PCR Primer	1 µl (100 pmol)
$MgCl_2$ (25 mM)	8 µl
Taq-Polymerase	1 µl (ca. 1 Unit)
Total volume	100 µl (mit dH_2O auffüllen)
Mineralöl	ca. 70 µl

Tabelle 5.8: Beispiel für ein typisches PCR Programm

Schritt	Temperatur (° C)	Zeit (Min.)	Zyklen
Denaturierung	95	7:00	1
Denaturierung	95	1:00	25
Anlagerung	58	1:00	
Extension	72	2:00	
Extension	72	7:00	1

Diese drei Schritte werden bis zu 30 mal wiederholt, wobei die jeweils neu synthetisierte DNA ebenfalls wieder als Matrize verwendet wurde und damit im Idealfall 2^n (n entspricht der Anzahl der Zyklen) DNA Moleküle aus einem DNA Molekül erhalten werden können.

5.6.6 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung mit den DNA-Sequenzern 377 und 373 (Perkin Elmer) basiert auf der Methode nach Sanger. Die DNA wird wie bei der PCR erst denaturiert und nach einem Primeranlagerungsschritt wird der zweite DNA Strang gebildet und auch in diesem Fall werden diese Schritte 25-30 mal durchlaufen. Es gibt jedoch zwei Unterschiede zur PCR:

- Es wird nur ein Primer pro Reaktion verwendet
- Den zugegebenen dNTP´s werden im Unterschuß Didesoxyribonukleotide (ddNTP´s) zugegeben, wobei jedes dieser ddNTP´s mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Wird nun bei der Extension des DNA Stranges ein ddNTP eingebaut, endet die Synthese dieses Stranges. Es entsteht also ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA Strängen, an deren Ende sich jeweils ein ddNTP mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt befindet.

In dieser Arbeit wurde das ABI Prism Dye Terminator bzw. ABI Prism Big Dye Terminator Kit (Fa. Perkin Elmer) verwendet. Ein üblicher Ansatz für die Sequenzierreaktion befindet sich in Tabelle 5.9, das PCR Programm in Tabelle 5.10.

Tabelle 5.9: Zusammensetzung einer typischen Sequenzierreaktion

Komponente	Volumen
DNA Sequenzierkit (Polymerase, Puffer, dNTP´s, ddNTP´s)	4 µl
DNA	4 µl (200 – 500 ng)
Primer (1 pmol $µl^{-1}$)	4 µl
dH_2O	8 µl
Endvolumen	20 µl

Tabelle 5.10: Programm zur Vervielfältigung von DNA zur DNA Sequenzierung

Schritt	Temperatur (° C)	Zeit (Min.)	Zyklen
Denaturierung	95	6:00	1
Denaturierung Anlagerung Extension	95 55 72	0:40 0:30 4:00	25
Extension	72	6:00	1

Die Sequenzierreaktion (normalerweise 20 µl) wurde mit 80 µl dH_2O vermischt und10 µl NaAc-Lösung (3 M, pH 5,3) sowie 250 µl Ethanol (100 %, RT) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 20 Minuten zentrifugiert (14000 Umin, Eppendorf 5417R, 16 °C), der Überstand vom Pellet sorgfältig entfernt, das Pellet mit 250 µl Ethanol (70 %, RT) gewaschen und nochmals 5 Minuten zentrifugiert (14000 Umin, Eppendorf 5417R, RT). Nach Entfernen des Alkohols wurde das Pellet im Vakuum getrocknet, bevor die DNA in 3 µl eines Gemisches (5:1) aus Formamid und EDTA (25 mM, pH 8,0) aufgenommen und denaturiert (2 Min., 90 °C) wurde.

Die Analyse der DNA Fragmente erfolgt in einem denaturierendem Harnstoffgel. Für dieses wurde 30 g Harnstoff (Gibco o. Roth) mit 9,0 ml 40 % (w/v) Acrylamidlösung (Acryl-amid:Bisacrylamid =19:1), 6 ml TBE-Puffer (10 x Puffer, Gibco o. Roth) und 23,5 ml dH_2O vermischt und unter Rühren leicht erwärmt, bis sich der Harnstoff vollständig löste. Nach

dem Filtrieren der Lösung wurden 24 µl TEMED, sowie 180 µl APS-Lösung (10 %(w/v)) zugegeben bevor sie zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde.
Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in den Sequenzer eingebaut und die Proben aufgetragen.
Die DNA Fragmente bewegen sich in diesem Gel auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Durch die Markierung der Basen mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen kann festgestellt werden, mit welcher Base ein DNA Fragment endet. Die Leseköpfe der DNA Sequenzer detektieren die Abfolge der Fluoreszenzfarbstoffe an einer bestimmten Stelle im Gel und bestimmen damit die Abfolge der dNTP´s.

5.6.7 Mutagenisierung mittels PCR

5.6.7.1 Mutagenisierung am Anfang und Ende eines Genfragments

Die PCR ist eine schnelle und einfache Methode um z. B. am Anfang und Ende eines Genes Schnittstellen einzuführen. Hierzu wurden Primer verwendet, die neben der für das Gen spezifischen Erkennungssequenz die Sequenz für die gewünschte Schnittstelle enthalten. Sind die mit der Ziel-DNA komplementären Sequenzen ausreichend lang gewählt, hybridisiert der Primer an die DNA des Gens und fusioniert damit die Schnittstelle an das Gen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik ebenfalls dazu verwendet, proteinbindende Sequenzen wie den His-tag an Proteine zu fusionieren.

5.6.8 Mutagenisierung mittels Quik Change™

Die Mutagenisierung mittels Quick Change funktioniert ähnlich wie eine PCR, auch wenn es genau genommen keine ist. In dieser wird das Plasmid nämlich nicht 2^n fach wie die DNA in der PCR amplifiziert, sondern nur 2n fach.
Zu dem Plasmid, das das zu mutierende Insert enthält, werden zwei Primer gegeben, die komplementär zu je einem Strang der DNA sind und die die Punktmutation in etwa in der Mitte des Oligonukleotids enthalten (siehe Abbildung 5.1, für einen typischen Quik Change-Ansatz siehe Tabelle 5.11). Diese zwei Primer binden an das Plasmid und das ganze Plasmid wird durch die *Pfu*-Polymerase synthetisiert, so daß zwei weitere DNA-Stränge entstehen, die die gewünschte Mutation enthalten. Diese werden im nächsten Schritt wieder voneinander

getrennt und der Elternstrang steht für den nächsten Programm-Zyklus (siehe Tabelle 5.12, vergleiche mit Tabelle 5.8) als Template zur Verfügung. In der Regel wird dieser Zyklus 25-30 mal wiederholt.

Im Quik Change-Ansatz ist nach der Amplifikation ein Gemisch aus Template – ohne die gewünschte Mutation – und neu synthetisierter DNA – mit der gewünschten Mutation – vorhanden, welches bei sofortiger Transformation zu einem Gemisch von Klonen mit und ohne Mutation führen würde. Da sich die Plasmide kaum unterscheiden, würde das einen erheblichen Aufwand bedeuten, eine Mutante zu identifizieren.

Da nun aber DNA aus lebenden Zellen methyliert vorliegt, die *in vitro* hergestellte jedoch nicht, kann man diese durch Verdau mit *Dpn*I das Ausgangsplasmid selektiv entfernen. Dieses Enzym verdaut selektiv nur methylierte DNA, so daß nur die *in vitro* neu synthetisierte DNA nach dem Verdau übrig bleibt.

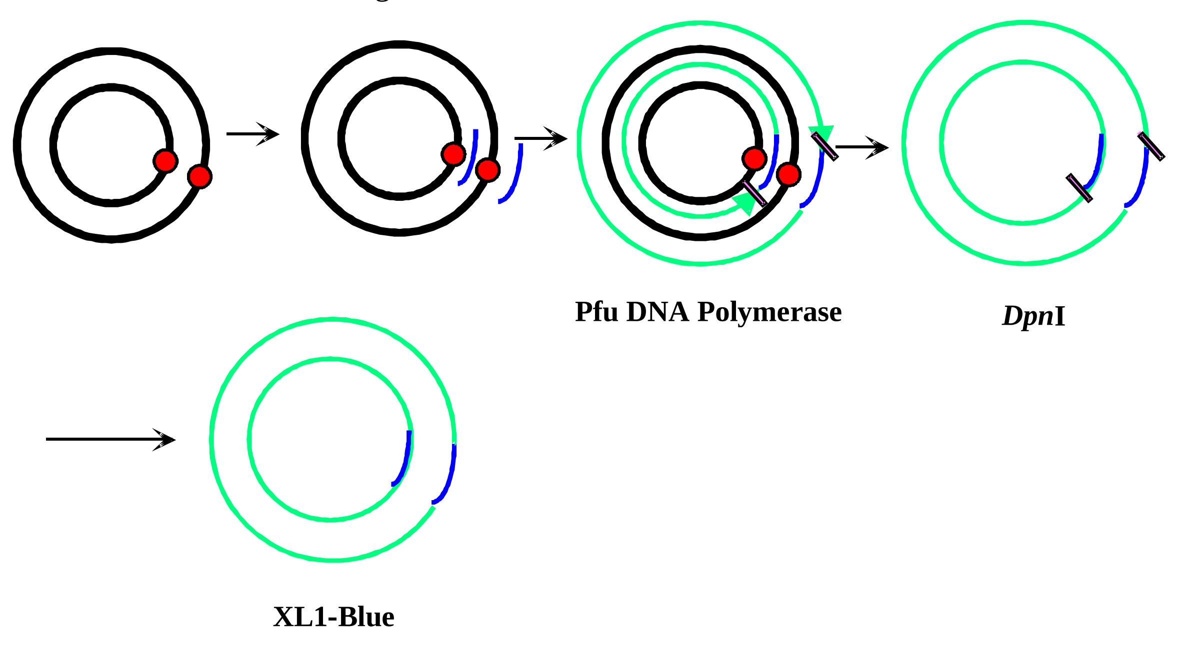

Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Mutagenese mit Quick Change. Die roten Kreise markieren die Stelle der gewünschten Mutation, Primer sind blau dargestellt, die Querbalken deuten die bei der *in vitro* Synthese enstehenden Einzelstrangbrüche des Tochterstrangs an, die nach dem Verdau mit *Dpn*I und der Transformation in *Epicurian coli in vivo* repariert werden.

Tabelle 5.11: Beispiel für einen typischen Ansatz zur Mutagenese durch Quick Change

Komponente	Volumen
10 x Puffer	10 µl
DNA	0,5 µl (ca. 100 ng)
Primer 1 (5 pmol μl^{-1})	2,5 µl
Primer 2 (5 pmol μl^{-1})	2,5 µl
dNTP´s	2 µl
(Turbo) - *Pfu*-Polymerase	1 µl
dH_2O	71,5 µl
Endvolumen	100 µl

Tabelle 5.12: Beispiel für ein Quick Change Programm im Thermocycler

Schritt	Temperatur (° C)	Zeit (Min.)	Zyklen
Denaturierung	95	0:30	1
Denaturierung Anlagerung Extension	95 55 68	0:30 1:00 9:00[1)]	25
Extension	68	9:00	1

[1)] Die Extensionszeit ist von der Größe des Plasmids abhängig, ungefähr 2 Minuten pro kb

Die *Dpn*I verdaute DNA wird dann in *Epicurian coli* XL1-Blue (Stratagene) transformiert. Die eingefrorenen Zellen wurden langsam im Eisbad aufgetaut und die mit *Dpn*I verdaute DNA zugegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung wurden die Zellen 30 Minuten mit der DNA auf Eis inkubiert und 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert und 0,5 ml LB-Medium zugegeben. Nach Inkubation für 1 h (37 °C) wurde der Ansatz kurz zentrifugiert, etwa 500 ml Überstand abgenommen und die resuspendierten Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg ml^{-1}) ausplattiert.

5.7 Arbeiten mit Proteinen

5.7.1 Proteinanalyse

5.7.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde analog Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Um Proteine der Größe zwischen 12 und 68 kDa zu trennen, wurden Gele verwendet, die entweder 10 % (w/v), 12,5 % (w/v) oder 15 % (w/v) Acrylamid enthielten. Normalerweise wurden Gele mit einem Anteil von 12,5 % (w/v) Acrylamid verwendet. Die Zusammensetzung der Gele und Puffer ist in Tabelle 5.13 zusammengefaßt.

Tabelle 5.13: Zusammensetzung der für die SDS PAGE benötigten Gele und Puffer

Sammelgel	1,0 ml 4 x Upper Tris (Tris-HCl (0,5 M), SDS (4 % (w/v)), pH 6,8); 0,52 ml Acrylamid (30 %(w/v)); 2,47 ml dH_2O; 40 µl APS; 8 µl TEMED
Trenngel (12,5 %)	2,0 ml 4 x Lower Tris (Tris-HCl (1,5 M), SDS (4 % (w/v)), pH 8); 3,33 ml Acrylamid (30 %(w/v)); 2,67 ml dH_2O; 40 µl APS; 8 µl TEMED
SDS-Probenpuffer	Glycerin (20 % (w/v)), 2-Mercaptoethanol (6 % (w/v)), Bromphenolblau (0,0025 % (w/v)) gelöst in 1 x Upper Tris
Laufpuffer	Tris-HCl (25 mM, pH 8,4), Glycerin (0,192 M), SDS (0,1 %)
Protein-Standard	Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Carbonsäureanhydrase (31,0 kDa), Trypsin Inhibitor (21,5 kDa) und Lysozyme (14 kDa)

Alternativ zu den selbst hergestellten wurden die SDS Gele (Gradient 8-25 mit denaturierenden Pufferstreifen) von Pharmacia (Freiburg, Deutschland) verwendet. Diese wurden im PHAST-System (Pharmacia) gefahren und auch in diesem mit Silber gefärbt (siehe 5.7.1.1.2).

5.7.1.1.1 Coomassie Färbung

Das Proteingel wurde 30 Minuten bis 12 h in der Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R-250 (0,1 % (w/v)), Methanol (30 % (v/v)), Eisessig (10 % (v/v) inkubiert. Das komplett

gefärbte Gel wurde in eine Entfärbelösung (Methanol (30 % (v/v), Eisessig (10 % (v/v)) überführt und solange inkubiert, bis der Hintergrund farblos wurde und die Proteinbanden deutlich hervortraten.

5.7.1.1.2 Silberfärbung

Phast Gele wurden im PHAST-System automatisch gefärbt. Die Lösungen wurden analog Butcher angesetzt (Butcher und Tomkins 1986).

5.7.1.1.3 Lipase Aktivitätstest auf SDS PAGE

Die Lipase wurde im Gel durch Inkubation in einer Renaturierungslösung (Tris-HCl (0,1 M; pH 7,5), Triton X-100 (0,5 % (w/v)); 30 Min.) renaturiert. Die Gele wurden danach ca. 30 Minuten (abhängig von der Aktivität) in einer Färbelösung (1-Naphtylacetat (20 mg) gelöst in 5 ml Aceton, gemischt mit 50 mg Fast Red TR gelöst in 45 ml Tris-HCl (0,1 M; pH 7,5)) inkubiert.

5.7.2 Blotten von Proteinen und N-terminale Proteinsequenzierung

Zum Blotten von Proteinen wurde zuerst eine SDS-PAGE (siehe 5.7.1.1) durchgeführt. Das Gel wurde danach jedoch nicht gefärbt, sondern 15 Min. in Kathodenpuffer (Tris-HCl (25 mM), Methanol 10 % (v/v); pH 9,4) äquilibriert. In dieser Zeit werden drei Filterpapiere derselben Größe vorbereitet und 7 Min. in den folgenden Lösungen inkubiert:

- Filterpapier 1 in Anodenpuffer 1 (Tris-HCl (0,3 M), Methanol (10 % (v/v); pH 10,4)
- Filterpapier 2 in Anodenpuffer 2 (Tris-HCl (25 mM), Methanol (10 % (v/v); pH 10,4)
- Filterpapier 3 in Kathodenpuffer (Tris-HCl (25 mM), Methanol (10 % (v/v); pH 9,4).

Die PVDF-Membran wurde ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten und erst kurz in Methanol (100 %) gespült. Danach wurde sie für 2-3 Minuten in Anodenpuffer 2 (Tris-HCl (25 mM), Methanol (10 % (v/v), pH 10,4) inkubiert.

Die verschiedenen Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden in Form eines Sandwiches in folgenden Reihenfolge in der Blotting-Kammer (unten Anode, oben Kathode) übereinandergelegt: 1. Filterpapier 1; 2. Filterpapier 2; 3. PVDF Membran; 4. SDS-PAGE Gel; 5. Filterpapier 3.

Eventuell noch vorhandene Luftblasen wurden mit einem Glasstab entfernt.
Nach dem Blotten (15-30 Min, 15 V) wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blau R-250 15 Min. gefärbt (Coomassie Brilliant Blau R-250 (0,025 % (w/v)) in Methanol (40 % (v/v)) und solange in der Entfärbelösung (Methanol (50 % (v/v)) inkubiert, bis der Hintergrund nahezu farblos war und die Proteinbanden deutlich hervortraten. Die Membran wurde mehrmals mit Wasser gespült, die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und an der Luft getrocknet.
Die N-terminale Sequenzierung wurde mit einem Proteinsequenzer von Applied Biosystems nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

5.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde durch Bichinconinsäure mit dem BCA Kit der Firma Pierce analog deren Empfehlungen durchgeführt. Der Test basiert auf der Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biureth Reaktion). Das entstehende Kupfer(I)-Ion wird durch das hochspezifische BCA-Reagenz durch einen Farbumschlag detektiert (Smith, *et al.* 1985). Der entstehende Chelatkomplex zeigt eine starke Absorptionsbande bei 562 nm, die linear mit der Proteinkonzentration (zwischen 25-2000 µg ml^{-1}) ansteigt.

5.8 Proteinreinigung

5.8.1 Reinigung der ROL aus *Pichia pastoris* in synthetischem und komplexem Medium

5.8.1.1 Konzentrierung der Überstände und Dialyse

Die aus verschiedenen Kultivierungen stammenden Überstände (Schüttelkolben, Fermenter mit synthetischem oder komplexem Medium) wurden je nach ihrem Volumen mit Rührzellen (Volumen 50 ml oder 500 ml) bzw. einer *Cross Flow* Apparatur diafiltriert. Die Überstände wurden in der Regel auf ca. 25 % reduziert und wieder auf dasselbe Volumen mit Wasser aufgefüllt und auf 20 % reduziert. Die Proteinkonzentrate wurden dann in Dialysemembranen (Spectra Por) überführt und mindestens 24 h, bei Kultivierungen in synthetischem Medium auch länger, gegen demineralisiertes Wasser dialysiert. In dieser Zeit wurde mindestens zweimal das Wasser gewechselt.

5.8.1.2 Ionenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose

Zur Konzentration und Feinreinigung wurde die Lipase-Lösung auf eine mit SP-Sepharose gepackte Säule aufgetragen, welche zuvor mit drei Säulenvolumen $CaCl_2$ Lösung (10 mM; pH=5,5) äquilibriert wurde. Daraufhin wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen $CaCl_2$ Lösung (10 mM; pH=5,5) gewaschen, bevor die Lipase über einen linearen Gradienten aus $CaCl_2$ Lösung (10 mM; pH=5,5) und derselben Lösung zuzüglich 1 M NaCl von der Säule eluiert wurde. Die Fraktionen, die Lipaseaktivität enthielten, wurden in der Regel gegen dH_2O dialysiert und lyophylisiert. Das getrocknete Protein wurde bei 4 °C gelagert.

5.8.1.3 *Hydrophobic Interaction Chromatography* mit Phenyl- und Butylsepharose

Die wie in Kapitel 5.8.1.2 gereinigte ROL aus synthetischem Medium wurde mittels HIC weiter aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Säulenmaterialien, Phenyl- und Butylsepharose (beide Pharmacia) verwendet. Der bei der Ionenaustausch-chromatographie verwendete Salzpuffer ($CaCl_2$ Lösung (10 mM; pH=5,5) mit 1 M NaCl) konnte dabei als Auftragungs und Waschpuffer verwendet werden. Die Elution erfolgte je-

weils mit linearen Gradienten zuerst mit dH_2O, dann mit Natriumcholat in Wasser (1% (w/v),gefolgt von Triton X-100 (1% (w/v) + 2 % (w/v)).

5.9 Bestimmung der Bindungseigenschaften von Peptidsequenzen aus der Zufallsmutagenese

Mit EGFP transformierte Klone, die auf der Agarplatte unter UV-Licht fluoreszierten, wurden in Mikrotiterplatten gepickt und über Nacht kultiviert. Die angewachsenen Kulturen wurden auf eine zweite Platte überimpft, die nach 16 h Inkubation bei 37 °C als sogenannte *Masterplate* bei –80 °C eingefroren wurden. Die Kulturen wurden durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen in der Mikrotiterplatte aufgeschlossen und die Mikrotiterplatten zentrifugiert. Der fluoreszierende klare Überstand wurde abgenommen und auf die Mikrotiterplatten-IMAC-Säulen überführt.

Diese wurden wie folgt hergestellt:

In Membranfilter-Mikrotiterplatten (Multiscreen 5 µm; Millipore) wurde dreimal eine gerührte Chelating Sepharose Emulsion (Pharmacia, Freiburg) eingefüllt und anschließend zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A4-62, 350 U min^{-1}, 2 Min.). Dadurch entstanden jeweils 5 mm hohe Mini-Säulen in jeder Kavität der Mikrotiterplatte. Alle folgenden Schritte wurden mit dem Beckmann 2000 Roboter ausgeführt und nach jedem Schritt wurde die Platte zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A4-62, 350 U min^{-1}, 2 Min.). Die Minisäulen wurden mit 250 µl dH_2O gewaschen und anschließend mit 250 µl Metallsalz-Lösung beschickt. Die Säulen wurden dreimal mit 200 µl IMAC-Puffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 mit 250 mM NaCl) gewaschen und äquilibriert. Nach Zugabe des Kulturüberstandes wurden die Säulen zweimal mit 200 µl IMAC-Puffer gewaschen und anschließend mit zweimal 100 µl Elutionspuffer (0,5 M Imidazol in IMAC-Puffer) in eine neue Mikrotiterplatte eluiert. Die Minisäulen konnten durch die Zugabe von 250 µl Regenerierungslösung (50 mM EDTA mit 1 M NaCl) regeneriert werden und standen für die nächste Screeningrunde zu Verfügung.

5.9.1 Metallaffinitätschromatographie (Ion Metal Affinity Chromatography, IMAC)

Das Säulenmaterial (20 ml Chelating Sepharose Fast Flow, (Pharmacia, Freiburg)) wurde in eine Säule mit dem Innendurchmesser von 16 mm gegossen. Zwei peristaltische Pumpen wurden eingesetzt um einen kontinuierlichen Fluß an Puffern der gewünschten Konzentrationen zu gewährleisten. Die Signale des UV-Detektors (LKB UV-MII) wurden von einem Schreiber (LKB RIC 102) aufgezeichnet. Einzelne Fraktionen wurden von einem Fraktionssammler (LKB FRAC-200) gesammelt (alles Pharmacia, Freiburg).
Das Säulenmaterial wurde mit 3 Säulenvolumen dH_2O äquilibriert und dann mit 3 Säulenvolumen Metall-Lösung (in der Regel Nickelchlorid (0,3 M)) beladen. Das Säulenmaterial wurde daraufhin mit 3 Säulenvolumen IMAC-Puffer (Natriumphosphat (50 mM; pH 7,5), NaCl (250 mM)) gewaschen und äquilibriert. Die vorbereitete Probe (1 ml) wurde über eine Probenschleife auf die Säule aufgebracht und mit einer Flußrate von 1,5 ml min^{-1} mit 4 Säulenvolumen IMAC Puffer gewaschen. Zur Elution wurde ein linearer Gradient (0,5 % Imidazol (0,5 M) in IMAC Puffer pro ml Puffer) verwendet. Um stark bindende Proteine zu lösen, wurde die Säule abschließend mit 3 Säulenvolumen Imidazol-Lösung (0,5 M) eluiert. Die Säule wurde mit EDTA (50 mM) und NaCl (1 M) regeneriert, um das Metall und eventuell noch bindende Proteine und Zellreste zu entfernen.

5.10 Aktivitätstests

5.10.1 Lipase Assays

5.10.1.1 pH-Stat Assay

Die Aktivität der ROL wurde normalerweise mit Triolein als Substrat in einem pH Stat (Metrohm) bestehend aus Dosimeter 665, Rührer 649, pH-Meter 620 und Impulsomat 614 gemessen. Triolein (20 mM) wurde mit Gummi Arabicum (2% (w/v)) in einem Ultraturrax (T25, Janke & Kunkel) gut durchmischt (7 Min.), bevor zu der entstandenen Emulsion $CaCl_2$ x 2 H_2O-Lösung (0,5 % (w/v)) zugegeben wurde. Von dieser Mischung wurden 20 ml in die Reaktionskammer gefüllt und auf die gewünschte Temperatur (meist 30 °C), sowie auf den gewünschten pH (meist 8,1), eingestellt. Nach der Zugabe von 25-100 µl Lipaselösung wurde

die Aktivität bestimmt. Die freigesetzten Fettsäuren wurden automatisch gegen 0,01 N NaOH titriert, um den pH konstant zu halten. Ein Unit (U) wurde definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol Fettsäure in einer Minute unter den gewählten Assay-Konditionen freisetzt.

5.10.1.2 pNPP-Schnelltest

Um schnell eine große Menge an Proben z. B. bei der Proteinreinigung testen zu können, wurde dieser Schnelltest verwendet (Winkler und Stuckmann 1979).
Lösung A besteht aus p-Nitrophenylpalmitat (pNPP, 10 mM) in Isopropanol gelöst. Lösung B aus Tris-Puffer (100 mM, pH 7,5), Cholat (0,8 % (w/v)) und Gummi Arabicum (1% (w/v)). Die separaten Lösungen können 2 Wochen bei –20 °C gelagert werden.
Die Reaktionsmischung setzt sich aus 9 Teilen Lösung B und einem Teil Lösung A zusammen und muß immer frisch angesetzt werden. Die zu untersuchende Lösung (50 µl) wurde in Mikrotiterplatten pipettiert und die Reaktionsmischung (200 µl) zugegeben. Die durch die Spaltung des Substrats entstehende gelbe Farbe wurde entweder visuell abgeschätzt oder spektrometrisch quantifiziert.

5.10.2 Fluoreszenz Assay

Die Fluoreszenz wurde in einem FluoStar (BMG) in schwarzen Mikrotiterplatten (Nunc) gemessen. Die gemessene Fluoreszenz wurde immer auf einen Standard bezogen und in % dieses Standards als relative Fluoreszenz angegeben.

6 Literatur

Basheer, S. K., Mogi, K.-I. und Nakajima, M. (1995). “Development of a novel hollow-fibre membrane reactor for the interesterification of triglycerides and fatty acids using modified lipase.” *Process. Biochem.* **30**, 531-536.

Bayle, D., Wangler, S., Weitzenegger, T., Steinhilber, W., Volz, J., Przybylski, M., Schafer, K. P., Sachs, G. und Melchers, K. (1998). “Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*.” *J. Bacteriol.* **180**, 317-329.

Beer, D. (1994). Untersuchung der Lipase aus *Rhizopus oryzae* auf molekularer Ebene: Das Gen, der Reaktionsmechanismuss und die Funktion der Prosequenz. Chemie. Hannover, Universität Hannover**,** 133.

Beer, H. D., McCarthy, J. E., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1998). “Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*.” *Biochim. Biophys. Acta* **1399**, 173-180.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1996). “Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants.” *Protein Eng.* **9**, 507-517.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., Schmid, R. D. und McCarthy, J. E. (1996). “The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence.” *Biochem J.* **319**, 351-359.

Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy (1991). “A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *E.coli*.” *Plasmid* **26**, 147-150.

Ben Salah, A., Fendri, K. und Gargoury, Y. (1994). “La Lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et charactéristique biochimiques.” *Rev. Fr. Corps Gras* **41**, 133-137.

Berger, M., Laumen, K. und Schneider, M. P. (1992). “Enzymatic esterification of glycerol I: Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols.” *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 955-960.

Berger, M. und Schneider, M. P. (1991). “Regioselectivity of lipases in organic solvents.” *Biotechnol. Lett.* **13**, 333-338.

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Wiliams, G. J. B., Meyer, E. F. J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). “The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures.” *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.

Biemans, R., Gregoire, D., Haumont, M., Bosseloir, A., Garcia, L., Jacquet, A., Dubeaux, C. und Bollen, A. (1998). “The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation.” *J. Biotechnol.* **66**, 137-146.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513.

Bornscheuer, U., Pleiss, J., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R. D. Lipases from *Rhizopus species*: genetics, structure and applications. in print.

Bornscheuer, U. T. (1995). “Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols.” *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 578-586.

Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J. (1999). Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselektive Biotransformations. Weinheim, Wiley-VCH.

Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., *et al.* (1990). “A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase.” *Nature* **343**, 767-770.

Braun, P., Waldmann, H. und Kunz, H. (1992). “Selective enzymatic removal of protecting functions: heptyl esters as carboxy protecting groups in glycopeptide synthesis.” *Synlett*, 39-40.

Braun, P., Waldmann, H., Vogt, W. und Kunz, H. (1990). “Selective enzymic removal of protecting functions: heptyl esters as carboxyprotecting groups in peptide synthesis.” *Synlett*, 105-107.

Braun, P., Waldmann, H., Vogt, W. und Kunz, H. (1991). “Selektive enzymatische Schutzgruppenabspaltungen: Der n-Heptylester als Carboxylschutzgruppe in der Peptidsynthese.” *Liebigs Ann. Chem.*, 165-170.

Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. und Schmid, R. D. (1998). “Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase.” *Protein Sci.* **7**, 1415-1422.

Butcher, L. A. und Tomkins, J. K. (1986). “Silver staining method useful for ultrathin polyacrylamid gels on support films.” *Anal. Biochem.* **148**, 384-388.

Cambillau, C. und van Tilbeurgh, H. (1993). “Structure of hydrolases - lipases and cellulases.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 885-895.

Cao, L., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1998). “Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar esters, IV: Selectivity of lipases towards primary and secondary hydroxyl groups incarbohydrates.” Biocatal. Biotransform. **16**, 249-283.

Cao, L., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1999). “Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme.” *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **6**, 279.

Carriere, F., Gargouri, Y., Moreau, H., Ransac, S., Rogalska, E. und Verger, R. (1994). Gastric lipases: cellular, biochemical and kinetic aspects. Lipases: their structures, biochemistry and application. Herausgeber: Woolley, P. und Petersen, S. B. Cambridge, Cambridge University Press**,** 181-206.

Catoni, E., Schmidt-Dannert, C., Brocca, S. und Schmid, R. D. (1997). "Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candium* in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties of functional expressed lipase B." *BioTechniques* **11**, 689-695.

Chaga, G., Andersson, L. und Porath, J. (1992). "Purification and determination of the binding site of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle on immobilized ferric ions." *J. Chromatogr.* **627**, 163-172.

Chaga, G., Hopp, J. und Nelson, P. (1999). "Immobilized metal ion affinity chromatography on Co^{2+}-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle." *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 19-24.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**, 802-805.

Chênevert, R., Pouliot, R. und Bureau, P. (1994). "Enantioselective hydrolysis of (+/-)-chloramphenicol palmitate by hydrolases." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2941-2944.

Cregg, J. (1999). Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene expression Systems - using nature for the art of expression. Herausgeber: Fernandez, J. M. und Hofftler, J. P. San Diego, Academic Press**,** 157-191.

Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., *et al.* (1987). "High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*." *Bio/Technology* **5**, 479-485.

Cregg, J. M., Vedvick, T. S. und Raschke, W. C. (1993). "Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*." *Biotechnology (NY)* **11**, 905-910.

Cygler, M., Schrag, J. D. und Ergan, F. (1992). "Advances in structural understanding of lipases." *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **10**, 143-184.

de Vries, Y., Arvidson, D. N., Waterham, H. R., Cregg, J. M. und Woldegiorgis, G. (1997). “Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*.” *Biochemistry* **36**, 5285-5292.

Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S. (1992). “Catalysis at the interface: the anatomy of a confirmational change in a triglyceride lipase.” *Biochemistry* **32**, 1532-1541.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J. und Derewenda, Z. S. (1994). “Current progress in in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi.” *Protein Eng.* **7**, 551-557.

Desnuelle, P. (1986). Pancreatic lipase and phospholipase. Molecular and cellular basis of digestion. Herausgeber: Desnuelle, P. Amsterdam, Elsevier**,** 275-296.

Despreaux, C. W. und Manning, R. F. (1993). “The dacA gene of *Bacillus stearothermophilus* coding for D-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*.” *Gene* **131**, 35-41.

DiDonato, M., Narindrasorasak, S., Forbes, J. R., Cox, D. W. und Sarkar, B. (1997). “Expression, purification, and metal binding properties of the N- terminal domain from the wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B).” *J. Biol. Chem.* **272**, 33279-33282.

Dodson, G. G., Lawson, D. M. und Winkler, F. K. (1992). “Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation.” *Faraday Discuss.*, 95-105.

Eberling, J., Braun, P., Kowalczyk, D., Schultz, M. und Kunz, H. (1996). “Chemoselective removal of protecting groups from *O*-glycosl amino acid and peptide (methoxyethoxy)ethyl esters using lipases and papain.” *J. Org. Chem.* **61**, 2638-2646.

Flaschel, E., Poppenborg, L., Neitzel, R., Miksch, G. und Friehs, K. (1998). “Affinitätsverfahren zur Gewinnung rekombinanter Proteine.” *BioTec* **5/6**, 26-29.

Flenker, J. und Spener, F. (1990). “Hydroxy-monoglycerides by lipases-catalyzed partial hydrolysis of castor oil.” *DECHEMA Biotechnol. Conf.* **4, Pt. A**, 139-142.

Gancet, C. (1990). “Catalysis by *Rhizopus arrhizus* mycelial lipase.” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **613**, 600-604.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A. (1995). “Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure.” *Yeast* **11**, 355-360.

Gilbert, E. J. (1993). “*Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning.” *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 634-645.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und M., C. (1993). “Insight into interfacial activation from an 'open' structure of *Candida rugosa* lipase.” *J. Biol. Chem.* **268**, 12843.

Haalck, L., Paltauf, F., Pleiss, J., Schmid, R. D., Spener, F. und Stadler, P. (1997). “Stereoselectivity of lipase from *Rhizopus oryzae* towards triacylglycerols and analogs: Computer-aided modeling and experimential validation.” *Methods Enzym.* **184**, 353-376.

Haas, M. J., Allen, J. und Berka, T. R. (1991). “Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*.” *Gene* **109**, 107-113.

Haas, M. J., Cichowicz, D. J. und Bailey, D. g. (1992). “Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*.” *Lipids* **27**, 571-576.

Haas, M. J. und Joerger, R. D. (1995). Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: Versatile catalysts in nature and the laboratory. Food Biotechnology Microorganisms. Herausgeber: Hui, Y. H. und Khachatourians, G. G. New York, VCH Publishers Inc.**,** 549-588.

Hagenson, M. J., Holden, K. A., Parker, K. A., Wood, P. J., Cruze, J. A., Fuke, M., Hopkins, T. R. und Stroman, D. W. (1989). "Expression of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast." *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 650-656.

Hayes, D. G. und Gulari, E. (1991). "1-Monoglyceride production from lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty acid in reverse micelles." *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 507-517.

Hayes, D. G. und Gulari, E. (1992). "Formation of polyol-fatty acid esters by lipases in reverse micellar media." *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 110-118.

Hayes, E. G. D. G. (1994). "Improvement of enzyme activity and stability for reverse micellar-encapsulated lipases in the presence of short-chain and polar alcohols." *Biocatalysis* **11**, 223-231.

Higgins, D. R. und Cregg, J. M. (1998). "Introduction to *Pichia pastoris*." *Methods Mol. Biol.* **103**, 1-15.

Holmberg, K., Lassen, B. und Stark, M. B. (1989). "Enzymatic glycerolysis of a triglyceride in aqueous and nonaqueous microemulsions." *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1796-1800.

Holmberg, K. und Österberg, E. (1988). "Enzymatic Preparation of Monoglycerides in Microemulsion." *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1544-1548.

Holmquist, M., Tessier, D. C. und Cygler, M. (1997). "High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*." *Protein Expr. Purif.* **11**, 35-40.

Holmquist, M., Tessier, D. C. und Cygler, M. (1997). “Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II.” *Biochemistry* **36**, 15019-15025.

Jaeger, K. E. (1994). “Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung.” *Bioeng.* **2**, 39-46.

Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. und Misset, O. (1994). “Bacterial lipases.” *FEMS Microbial. Rev.* **15**, 29-63.

Joerger, R. D. und Haas, M. J. (1993). “Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*.” *Lipids* **28**, 81-88.

Joerger, R. D. und Haas, M. J. (1994). “Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis.” *Lipids* **29**, 377-384.

Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformation with Lipases. Biotechnology. Herausgeber: Rehm, H.-J. und Reed, G. Weinheim, Wiley-VCH. **8a,** 37-191.

Kermasha, S., Safari, M. und Goetghebeur, M. (1995). “Interesterification of butter fat by lipase from *Rhizopus niveus* in cosurfactant-free microemulsion system.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**, 229-244.

Khono, M., Funatsu, J., Mikami, B., Kugimiya, W., Matsuo, T. und Morita, Y. (1996). “The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 angstroms resolution.” *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 505-510.

Klein, R. R., King, G., Moreau, R. A. und Haas, M. J. (1997). “Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenisis and molecular modeling.” *Lipids* **32**, 123-131.

Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985). “Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.” *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.

Kugimiya, W., Otani, Y., Kohno, M. und Hashimoto, Y. (1992). “Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *Rhizopus niveus* lipase.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 716-719.

Kunz, H., Kowalczyk, D., Braun, P. und Braum, G. (1994). “Enzymatische Hydrolyse hydrophiler Diethylenglycol- und Polyethylenglycolester von Peptiden und Glycoproteinen durch Lipasen.” *Angew. Chem.* **106**, 353-355.

Kwon, S. J., Han, J. J. und Rhee, J. S. (1995). “Production and in situ preparation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane.” *Enzyme Microb. Techol.* **17**, 700-704.

Laemmli, U. K. (1970). “Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* **227**, 680-685.

Laroche, Y., Storme, V., De Meutter, J., Messens, J. und Lauwereys, M. (1994). “High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.” *Biotechnology (N Y)* **12**, 1119-1124.

LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. und McCoy, J. M. (1993). “A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm.” *Biotechnology (N Y)* **11**, 187-193.

Le Grice, S. F. und Gruninger-Leitch, F. (1990). “Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography.” *Eur. J. Biochem.* **187**, 307-314.

Luria, S. E., Adams, J. N. und Ting, R. C. (1960). “Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particle.” *Virology* **12**, 348-390.

Marangoni, D. R. A. G. (1995). “Engineering triacylglycerols: The role of interesterification.” *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 329-335.

Melchers, K., Weitzenegger, T., Buhmann, A., Steinhilber, W., Sachs, G. und Schafer, K. P. (1996). “Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori*.” *J. Biol. Chem.* **271**, 446-457.

Millqvist, A., Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1994). “Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides.” *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 1042-1047.

Millqvist-Fureby, A., Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1996). “Glyceride synthesis in a solvent-free system.” *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 1489-1495.

Mogi, K.-J. und Nakajima, M. (1996). “Selection of surfactant-modified lipases for interesterification of triglyceride and fatty acid.” *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 1505-1512.

Mojovic, L., Siler-Marinkovic, G., Kukic, B., Bugarski, B. und Vunjak-Novakovic, G. (1994). “*Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of palm oil midfraction in a gas-lift reactor.” *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 159-162.

Monosov, E. Z., Wenzel, T. J., Luers, G. H., Heyman, J. A. und Subramani, S. (1996). “Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells.” *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 581-589.

Mukherjee, K. D. (1994). Lipases from plants. Lipases, their structure, biochemistry and application. Herausgeber: Woolley, P. und Petersen, S. B. Cambridge, Cambridge University Press**,** 49-76.

Node, M., Inoue, T., Araki, M., Nakamura, D. und Nishide, K. (1995). “An asymmetric synthesis of C_2-symmetric dimethyl 3,7-dioxo-*cis*-bicyclo-[3.3.0]octane-2,6-dicarboxylate by lipase-catalyzed demethoxycarbonylation.” *Tetrahedron Lett.* **36**, 2255-2256.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K. und Silver, S. (1989). “Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3544-3548.

Oba, T. und Witholt, B. (1994). “Interesterification of milk fat with oleic acid catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase.” *J. Dairy Sci.* **77**, 1790-1797.

Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. und Solioz, M. (1993). “Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*.” *J. Biol. Chem.* **268**, 12775-12779.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S. J. und Silman, I. (1992). “The α/β hydrolase fold.” *Protein Eng.* **5**, 197-211.

Poppenborg, L., Friehs, K. und Flaschel, E. (1997). “The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring.” *J. Biotechnol.* **58**, 79-88.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975). “Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.” *Nature* **258**, 598-599.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J. (1992). “Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.” *Gene* **111**, 229-233.

Ransac, S., Carriére, F., Rogalska, E., Verger, R., Marguet, F., Buono, G., Melo, E. P., Cabral, J. M. S., Egloff, M. P. E., van Tilbeurgh, H. und Cambillau, C. (1996). The kinetics and specificities and structural features of lipases. Molecular dynamics of biomembranes. Herausgeber: Kamp, J. Berlin, Springer. **H 96,** 265-304.

Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. und Verger, R. (1993). “Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases.” *Chirality* **5**, 24-30.

Romanos, M., Scorer, C., Sreekrishna, K. und Clare, J. (1998). “The generation of multicopy recombinant strains.” *Methods Mol. Biol.* **103**, 55-72.

Romanos, M. A., Scorer, C. A. und Clare, J. J. (1992). “Foreign gene expression in yeast: a review.” *Yeast* **8**, 423-488.

Rosenfeld, S. A., Nadeau, D., Tirado, J., Hollis, G. F., Knabb, R. M. und Jia, S. (1996). "Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *Protein Expr. Purif.* **8**, 476-482.

Sahasrabudhe, A. V., Solapure, S. M., Khurana, R., Suryanarayan, V., Ravishankar, S., deSousa, S. M. und Das, G. (1998). "Production of recombinant human bile salt stimulated lipase and its variant in *Pichia pastoris*." *Protein Expr. Purif.* **14**, 425-433.

Sambroock, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Savino, R., Lahm, A., Salvati, A. L., Ciapponi, L., Sporeno, E., Altamura, S., Paonessa, G., Toniatti, C. und Ciliberto, G. (1994). "Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation." *Embo J.* **13**, 1357-1367.

Scheib, H., Pleiss, J., Kovac, A., Paltauf, F. und Schmid, R. D. (1999). "Stereoselectivity of Mucorales lipases toward triradylglycerols--a simple solution to a complex problem." *Protein Sci.* **8**, 215-221.

Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F. und Schmid, R. D. (1998). "Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols." *Protein Eng.* **11**, 675-682.

Schipper, M. A. A. (1984). "A revision of the genus *Rhizopus* II. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*." *Stud. Mycol.* **25**, 1-19.

Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). "Lipases - interfacial enzymes with attractive applications." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 1608-1633.

Scopes, R. K. (1993). Protein Purification. Berlin, Springer.

Sheldon, R. A. (1996). Large-scale enzymatic conversion in non-aqueous media. Enzymatic reactions in organic media. Herausgeber: Koskinen, A. M. P. und Klibanov, A. M.**,** 266-307.

Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T. W. und Cregg, J. M. (1998). “A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*.” *Gene* **216**, 93-102.

Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H. und Tominaga, Y. (1996). “Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase.” *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 299-303.

Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Nagao, T., Suenaga, M., Nakai, S. und Tominaga, Y. (1997). “Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis.” *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 321-327.

Skory, C. D., Freer, S. N. und Bothast, R. J. (1996). “Expression and secretion of the *Candida wickerhamii* extracellular beta- glucosidase gene, bglB, in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Curr. Genet.* **30**, 417-422.

Smith, P. K., Krohn, R., Hermanson, R. I., Mallia, A. K. und Gartner, F. H. (1985). “Measurement of protein using bichinchoninic acid.” *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U., Menge, U. und Schmid, R. D. (1997). “Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase.” *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 427-433.

Sporeno, E., Barbato, G., Graziani, R., Pucci, P., Nitti, G. und Paonessa, G. (1994). “Production and structural characterization of amino terminally histidine tagged human oncostatin M in *E. coli*.” *Cytokine* **6**, 255-264.

Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A. und Birkenberger, L. A. (1997). “Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.” *Gene* **190**, 55-62.

Sreekrishna, K. und Kropp, K. E. (1996). Pichia pastoris. Nonconventional yeasts in Biotechnology - a handbook. Herausgeber: Wolf, K. Berlin, Springer-Verlag**,** 203-250.

Stratton, J., Chiruvolu, V. und Meagher, M. (1998). “High cell-density fermentation.” *Methods Mol. Biol.* **103**, 107-120.

Su, W., Huber, S. C. und Crawford, N. M. (1996). “Identification *in vitro* of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase.” *Plant Cell (Cambridge, Mass.)* **8**, 519-527.

Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H. D., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. und Tanaka, A. (1998). “Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisae*.” *J. Ferm.* **86**, 164-168.

Tanaka, M., Norimine, Y., Fujita, T., Suemune, H. und Sakai, K. (1996). “Chemoenzymatic synthesis of antiviral carbocyclic nucleosides: Asymetric hydrolysis of *meso*-3,5-bis(acetoxymethyl)cyclopentened using *Rhizopus delemar* lipase.” *J. Org. Chem.* **61**, 6952-6957.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., *et al.* (1997). “The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*” *Nature* **388**, 539-547. (Erratum erschien in *Nature* 1997 **389**, 412.)

Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. und Grinna, L. (1987). “High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.” *Bio/Technology* **5**, 1305-1308.

Tsujisaka, Y., Okumura, S. und Iwai, M. (1977). “Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipases.” *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 415-422.

Uejima, A., Fukui, T., Fukusaki, E., Omata, T., Kawamoto, T., Sonomoto, K. und Tanaka, A. (1993). “Effective kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 482-486.

Uyttenbroeck, W., Hendriks, D., Vriend, G., de Baere, I., Moens, L. und Scharpé, S. (1993). "Molecular characterization of an extracellular acid-resistance lipase produced by *Rhizopus javanicus*." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 245-254.

van Heeke, G., Ott, T. L., Strauss, A., Ammaturo, D. und Bazer, F. W. (1996). "High yield expression and secretion of ovine pregnancy recognition hormone interferon-τ by *Pichia pastoris*." *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 119-126.

Villeneuve, T. A. F. P. (1997). "Lipase specificities: Potential applications in lipid bioconversions." *Inform* **8**, 640-650.

Vollmer, P., Peters, M., Ehlers, M., Yagame, H., Matsuba, T., Kondo, M., Yasukawa, K., Buschenfelde, K. H. und Rose-John, S. (1996). "Yeast expression of the cytokine receptor domain of the soluble interleukin-6 receptor." *J. Immunol. Methods* **199**, 47-54.

Volz, J., Bosch, F. U., Wunderlin, M., Schuhmacher, M., Melchers, K., Bensch, K., Steinhilber, W., Schafer, K. P., Toth, G., Penke, B., *et al.* (1998). "Molecular characterization of metal-binding polypeptide domains by electrospray ionization mass spectrometry and metal chelate affinity chromatography." *J. Chromatogr. A* **800**, 29-37.

Waldinger, C. und Schneider, M. P. (1996). "Enzymatic esterification of glycerol III. Lipase-catalyzed synthesis of regioisometrically pure 1,2-sn-diacylglycerols and 1(3)-*rac*-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids." *J. Am. Oil Chem. Soc* **73**, 1513-1519.

Waldinger, M. S. C. (1996). "Enzymatic esterification of glycerol III. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols and 1(3)-rac-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids." *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 1513-1519.

Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. und Cregg, J. M. (1997). "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* **186**, 37-44.

Wegner, E. H. (1983). "Biochemical conversion by yeast fermentation at high cell densities." **Phillips Petroleum Company** Patentnr. 4,414,329

Weiss, A. (1990). “Enzymic preparation of solid fatty acid monoglycerides.” *Fett Wiss. Technol.* **92**, 392-396.

Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990). “Structure of human pancreatic lipase.” *Nature* **343**, 771-774.

Winkler, U. K. und Stuckmann, M. (1979). “Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marescens*.” *J. Bacteriol.* **138**, 665-670.

Wisdom, R. A., Dunnill, P. und Lilly, M. D. (1987). “Enzymatic interesterification of fats: Laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*.” *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 1081-1085.

Wood, M. J. und Komives, E. A. (1999). “Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation.” *J. Biomol. NMR* **13**, 149-159.

Yadwad, V. B., Ward, O. P. und Noronha, L. C. (1991). “Application of lipase to concentrate the docosahexaenoic acid (DHA) fraction of fish oil.” *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 956-959.

Yang, F., Moss, L. G. und Phillips, G. N. (1996). “The molecular structure of green fluorescent protein.” *Nature Biotechnology* **14**, 1246-1251.

Yang, Y., Chase, H. und Liu, G. (1998). “Selection of affinity ligands for protein purification from proteolytic digests.” *BioTechniques* **12**, 245-251.

Yokozeki, K., Yamanaka, K., Takinami, Y., Hirose, A., Tanaka, A., Sonomoto, K. und Fukui, S. (1982). “Application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent.” *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 1-5.

Zhu, A., Monohan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Leng, L. und Goldstein, J. (1995). “High-level expression and purification of coffee bean α-galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*.” *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 65-70.

Lebenslauf

Name	Stefan Minning
Geburtsdatum/ -ort	21. Februar 1969 in Stuttgart

Wissenschaftliche Ausbildung:

Oktober 1990 – Dezember 1996	Chemie-Studium an der Universität Stuttgart
Juni 1996 – Dezember 1996	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid, Institut für Technische Biochemie Universität Stuttgart: Thema: *Enzymatische Perhydrolyse*
Seit Februar 1997	Promotion bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid, Institut für Technische Biochemie Universität Stuttgart: Thema: *Die Lipase aus* Rhizopus oryzae*:* *Klonierung, Expression, Reinigung und Mutagenese eines industriell relevanten Enzyms für die Biokatalyse und die Strukturbestimmung*
September 1998 - November 1998	Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. Carles Solá, Departament d'Enginyeria Química Universitat Autònoma de Barcelona, Spanien *Optimierung der Fermentation von* Pichia pastoris.

Grundwehrdienst:

Juli 1989 – September 1990	5. Pionierbataillon 10 in Ingolstadt

Schulbildung:

1975 – 1979	Grundschule in Waiblingen-Hohenacker
1979 – 1989	Staufer-Gymnasium in Waiblingen
April 1989	Allgemeine Hochschulreife